

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Modulación de la microbiota intestinal de *Apis mellifera* por  
parásitos de interés apícola**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Daniel Aguado López**

**DIRIGIDA POR**

**Raquel Martín Hernández**  
**Mariano Higes Pascual**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

Modulación de la microbiota intestinal de *Apis mellifera* por parásitos de interés apícola

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Aguado López

DIRECTORES

Raquel Martín Hernández  
Mariano Higes Pascual

Tesis Doctoral

Madrid 2025

**Modulación de la  
microbiota intestinal de  
*Apis mellifera* por  
parásitos de interés apícola**

**Daniel Aguado López**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID  
Facultad de Veterinaria

Dirigida por:

**Dra. Raquel Martín Hernández**

**Dr. Mariano Higes Pascual**







**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

Modulación de la microbiota intestinal de *Apis mellifera* por parásitos  
de interés apícola

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Aguado López

DIRECTORES

Dra. Raquel Martín Hernández

Dr. Mariano Higes Pascual

2025





Dra. Raquel Martín Hernández, Investigadora del Laboratorio de Patología Apícola del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental del Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (CIAPA-IRIAF) de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM); y Dr. Mariano Higes Pascual, Investigador Titular del Laboratorio de Patología Apícola, CIAPA-IRIAF (JCCM),

**CERTIFICAN**

Que Daniel Aguado López, Graduado en Biología y Postgraduado en Biotecnología y Seguridad Alimentarias, ha realizado bajo nuestra supervisión los trabajos de investigación desarrollados en la memoria de Tesis Doctoral titulada “Modulación de la microbiota intestinal de *Apis mellifera* por parásitos de interés apícola”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

VºBº Directora de Tesis  
Dra. Raquel Martín Hernández

VºBº Director de Tesis  
Dr. Mariano Higes Pascual



*El trabajo presentado en esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado en el Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CLAPA), adscrito al Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRLAF) de la Consejería de Agricultura, Medio Ambiente y Desarrollo Rural de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, y en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de la Dra. Raquel Martín Hernández y el Dr. Mariano Higes Pascual, y bajo la tutela del Dr. Juan Miguel Rodríguez Gómez. El autor ha sido beneficiario de la convocatoria del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad según la Resolución de 3 de octubre de 2018, de la Presidencia de la Agencia Estatal de Investigación que aprobó la convocatoria, correspondiente al año 2018 de las ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores, en el Subprograma Estatal de Formación, del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad en I+D+i, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020 (Referencia predoctoral: PRE2018-084878) y del proyecto de investigación RTA2017-00004-C02-01. Asimismo, este trabajo contó con la ayuda para la realización de proyectos de investigación científica y transferencia de tecnología, cofinanciada por Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (Identificador: 430464), según la Resolución del 18 de diciembre de 2018, de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes (Expediente: SBPLY/19/180501/000334). Durante el desarrollo de la misma, el autor ha realizado una estancia nacional en el Grupo de Investigación en Medicina Genómica del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), bajo la supervisión del Prof. Dr. Xulio Maside Rodríguez y la Dra. Carolina Bartolomé Husson. Las fotografías que ilustran esta memoria han sido realizadas por Javier Almagro, Jesús García, Mariano Higes y Daniel Aguado López, y post-procesadas por Daniel Aguado López. Las figuras iconográficas originales han sido creadas por Daniel Aguado López.*



“Aprendí allí el nombre y las costumbres de las independientes recolectoras que no miramos jamás, tomándolas por moscas vulgares, avispas malhechoras o estúpidos coleópteros. Y, sin embargo, cada una de ellas lleva, bajo el doble par de alas que las caracteriza en el país de los insectos, un plan de vida, los útiles y la idea de un destino diferente y a menudo maravilloso.”

Maurice Mæterlinck (1862-1949)

La vida de las abejas.



A mi hermano, Mario

A mis padres, Ángel y Carmen

A mi familia



# ÍNDICE

<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
1. MICROBIOTA Y EVOLUCIÓN DE SU ESTUDIO .....	17
1.1. Insectos.....	18
2. APARATO DIGESTIVO DE LAS ABEJAS.....	19
3. MICROBIOTA INTESTINAL BACTERIANA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS .....	22
3.1. Especificidad de la microbiota a su especie hospedadora .....	25
3.2. Funciones de la microbiota intestinal.....	26
3.3. Adquisición de la microbiota intestinal en obreras.....	30
3.4. Microbiota intestinal de las castas reproductivas .....	32
3.5. Factores influyentes en la microbiota intestinal.....	33
3.6. Microbiota intestinal no bacteriana.....	39
4. PARÁSITOS INTESTINALES DE LAS ABEJAS.....	40
4.1. Microsporidios.....	40
4.1.1. Principales especies de microsporidios en abejas melíferas...	41
4.1.2. Estructuras celulares características .....	43
4.1.3. Ciclo biológico .....	44
4.1.4. Transmisión.....	45
4.1.5. Efectos en la salud de las abejas .....	46
4.1.6. <i>N. ceranae</i> y microbiota intestinal .....	49
4.2. Tripanosomátidos .....	50
4.2.1. Principales especies en abejas melíferas .....	50
4.2.2. Estructuras celulares características .....	52
4.2.3. Ciclo biológico .....	54

4.2.4.	Transmisión.....	55
4.2.5.	Efectos en la salud de las abejas .....	56
4.2.6.	Tripanosomátidos y microbiota intestinal.....	58
5.	OTROS PARÁSITOS NO INTESTINALES .....	59
5.1.	<i>Varroa destructor</i> .....	59
5.1.1.	Características morfológicas.....	60
5.1.2.	Ciclo biológico .....	61
5.1.3.	Efectos en la salud de las abejas .....	63
5.1.4.	<i>V. destructor</i> y microbiota intestinal.....	65
6.	PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS.....	66
	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
	<b>METODOLOGÍA GENERAL .....</b>	<b>75</b>
	<b>CAPÍTULO I. Comparación de métodos de extracción de ADN para la detección y cuantificación de bacterias intestinales y parásitos de abejas melíferas.....</b>	<b>85</b>
	<b>CAPÍTULO II. Prevalencia de tripanosomátidos en colonias de <i>Apis mellifera</i> de zonas geográficamente aisladas con movimientos apícolas restringidos .....</b>	<b>121</b>
	<b>CAPÍTULO III. Influencia de <i>Varroa destructor</i>, <i>Nosema ceranae</i> y <i>Lotmaria passim</i> en la microbiota intestinal de las abejas .....</b>	<b>143</b>
	<b>CAPÍTULO IV. Influencia de la edad de infección experimental con <i>Nosema ceranae</i> en la microbiota intestinal de abejas obreras (<i>Apis mellifera iberiensis</i>) .....</b>	<b>179</b>
	<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>201</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>213</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>217</b>
	<b>ANEXO I. Publicaciones científicas.....</b>	<b>277</b>
	<b>ANEXO II. Participación en congresos .....</b>	<b>305</b>
	<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>311</b>

## ABREVIATURAS

**μL:** microlitro, unidad de medida de volumen

**μm:** micrómetro o micra, unidad de medida de longitud

**μM:** micromolar, unidad de concentración

**°C:** grado Celsius, unidad termométrica

**AEMPS:** Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

**ARNr 16S:** gen de la subunidad ribosomal pequeña bacteriano

**ARNr 18S:** gen de la subunidad ribosomal pequeña eucariota

**ARNr 28S:** gen de la subunidad ribosomal grande eucariota

**A:** adenina, base nitrogenada

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNk:** ADN del kinetoplasto

**Am-COI:** gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa de *Apis mellifera*

**ARMm:** ARN mensajero

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNr:** ARN ribosomal

**ASV:** *Amplicon Sequence Variants*, o variante de la secuencia del amplicón

**ATCC:** American Type Culture Collection, o Colección Americana de Cultivos Tipo

**ATL:** tampón ATL

**BS:** BioSprint, sistema automático de extracción de ácidos nucleicos

**C:** citosina, base nitrogenada

**CA:** California, estado de los Estados Unidos

**CIAPA:** Centro de Investigación Apícola y Agroambiental

## Abreviaturas

**CiMUS:** Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas

**CLM:** Castilla-La Mancha

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono (gas)

**Cp:** *crossing point*, o punto de corte del ciclo de amplificación con el umbral, calculado mediante el estadístico de Máximo de la 2ª derivada, en la qPCR. Es equivalente a Ct (*cycle threshold value*)

**Cytb:** gen que codifica para la proteína *Citocromo b*

**DWV:** *deformed wing virus*, o virus de alas deformadas

**EURL:** Laboratorio de Referencia de la Unión Europea

**EVs:** *extracellular vesicle*, o vesículas extracelulares

**FAZ:** *flagellum attachment zone*, o zona de adhesión del flagelo

**FOR:** *forward sequence*, o secuencia directa (5'-3'), referente al cebador que anilla en la hebra de ADN dirección 3'-5'.

**g/L:** gramos por litro, medida de concentración

**g/RCF:** fuerza centrífuga relativa o fuerza g

**g:** gramo, unidad de medida de masa

**G:** guanina, base nitrogenada

**gapdh:** gen que codifica para la proteína *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*

**GLM:** *Generalised Linear Model*, o modelo lineal generalizado

**gp63:** gen que codifica para la glicoproteína de 63 kDa

**HTS:** *High-Throughput Sequencing*, o secuenciación de alto rendimiento

**Hz:** hercio, unidad de medida de frecuencia

**IA:** Iowa, estado de los Estados Unidos

**INIA:** Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

**IRIAF:** Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal

**its:** *internal transcribed spacer*, o espaciador transcrito interno

**JCCM:** Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

**LD:** Límite de Detección

**LMR:** Límite Máximo de Residuos

**LNA:** *locked nucleic acids*, o ácidos nucleicos bloqueados

**Lp1:** haplotipo de *L. passim* que se corresponde con la secuencia MT558272.1 de GenBank

**Lp2:** haplotipo de *L. passim* que se corresponde con la secuencia LT976801.1 de GenBank

**M:** concentración molar o molaridad

**MA:** Massachusetts, estado de los Estados Unidos

**MET:** Microscopía Electrónica de Transmisión

**mL:** mililitro, unidad de medida de volumen

**MO:** Microscopía Óptica.

**ng:** nanogramo, unidad de medida de masa

**NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica.

**P:** Proteasa.

**p.e.:** post-emergencia

**p.i.:** post-infección

**pb:** pares de bases nitrogenadas, medida de la longitud de un fragmento genético

**PCR:** *polymerase chain reaction*, o reacción en cadena de la polimerasa

**PCoA:** *Principal Coordinates Analysis*, o análisis de coordenadas principales

**PK:** Proteínasa K

**ptp3:** gen que codifica para la proteína del túbulo polar

**p/v:** peso/volumen, medida de concentración

## Abreviaturas

**qPCR:** *real-time-quantitative PCR*, o PCR cuantitativa en tiempo real

**REV:** *reverse sequence*, o secuencia reversa (3'-5'), referente al cebador que anilla en la hebra de ADN dirección 5'-3'

**ROS:** *reactive oxygen species*, o especies reactivas del oxígeno

**rpb1:** gen que codifica la subunidad mayor de la proteína *RNA polimerasa II*

**Rpm:** revoluciones por minuto

**SEM:** *scanning electron microscope*, o microscopía electrónica de barrido

**SSU rRNA:** ARN de la subunidad menor del ribosoma

**T:** timina, base nitrogenada

**TE:** tampón Tris-EDTA.

**Tm:** Melting temperatura, Temperatura de melting

**TOPII:** gen que codifica para la proteína *ADN Topoisomerasa II*

**U/mL:** unidades por mililitro, medida de concentración

**UCM:** Universidad Complutense de Madrid

**UE:** Unión Europea

**USC:** Universidad de Santiago de Compostela

**v/v:** volumen/volumen, medida de concentración

## FIGURAS

### Revisión bibliográfica

**Figura 1.** Representación esquemática del aparato digestivo de las abejas melíferas adultas y sus principales partes.

**Figura 2.** Representación esquemática de la distribución en el aparato de digestivo de las principales especies bacterianas intestinales de las abejas melíferas adultas.

**Figura 3.** Bacterias intestinales predominantes en las castas reproductivas.

**Figura 4.** Ciclo biológico de las abejas melíferas y cambios asociados a la microbiota intestinal de las obreras.

**Figura 5.** Esquema de los componentes celulares de una espora de *N. ceranae*.

**Figura 6.** Imagen de microscopía óptica (MO) del epitelio del ventrículo infectado con esporas de *N. ceranae* a los 7 días tras la infección a la izquierda; e imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de células con esporas de *N. ceranae* en su interior a los 3 días tras la infección, a la derecha. M: Merontes; EM: Esporas maduras.

**Figura 7.** Esquema de la estructura celular de *L. passim* y sus orgánulos.

**Figura 8.** Imagen de microscopía óptica (MO) del íleon con células de *C. mellifica* libres o adheridas al epitelio, a la izquierda; e imagen mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) del morfotipo haptomona de *L. passim* adherida a la superficie del recto, a la derecha. ax: axonema; fd: flagelopodio; k: cinetoplasto; m: mitocondria; n: núcleo; sm: microtúbulos subpeliculares.

**Figura 9.** Estructuras principales de la hembra adulta de *V. destructor*.

**Figura 10.** Zángano, a la izquierda; y obrera, a la derecha, siendo parasitados con *V. destructor*.

### Metodología general

**Figura 11.** Manejo de abejas adultas en las colmenas. Colmenar Experimental del CIAPA de Marchamalo, a la izquierda; y recogida de abejas obreras adultas, a la derecha.

**Figura 12.** Procesado de muestras. *Stomacher 80 Biomaster* y bolsas estériles con filtro, a la izquierda; líquido obtenido del macerado conjunto de las abejas, a la derecha.

**Figura 13.** Termociclador de PCR convencional, a la izquierda; termociclador de qPCR, a la derecha.

## **Capítulo I**

**Figura 14.** Esquema de los diferentes protocolos de extracción de ADN utilizados para el procesado de las muestras, volumen de muestra utilizado en cada uno de ellos, volúmenes de reactivos añadidos a las muestras y tiempos de incubación.

**Figura 15.** Muestras extraídas con los métodos automáticos (izquierda) y con los métodos basados en el tampón TE (derecha).

**Figura 16.** Valores de Cp de *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

**Figura 17.** Valores de Cp de *Ba. apis* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

**Figura 18.** Valores de Cp de *F. perrara* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

**Figura 19.** Valores de Cp de *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

**Figura 20.** Valores de Cp de *N. ceranae*, *L. passim* y bacterias intestinales en cada uno de los métodos de extracción tras 14 meses de la extracción del ADN.

## Capítulo II

**Figura 21.** Prevalencia (%) de *Trypanosomatidae* en cada una de las islas analizadas en el período 2014-2015 y 2020.

**Figura 22.** Variación de un nucleótido (T/C) en la secuencia del gen *rpb1* entre los dos haplotipos mayoritarios de *L. passim* en la posición 29. Las marcas y la numeración indican la posición en la secuencia en pares de bases. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

**Figura 23.** Proporción de los dos haplotipos principales de *L. passim* (Lp1 y Lp2) y de las variantes de estos (Otros) detectados en cada isla.

**Figura 24.** Distribución geográfica de *C. bombi* y *L. passim* (con sus haplotipos) en el archipiélago de las Azores (a) y Madeira (b). 🌞 Islas con presencia de *V. destructor*. 🍷 Islas con presencia de *N. ceranae*. El color rojo en los gráficos de sectores indica el porcentaje de secuencias que coinciden con el haplotipo Lp1, mientras que el color rosa indica el porcentaje de secuencias que coinciden con el haplotipo Lp2 ● *C. bombi* + *L. passim*; ● *C. bombi*; ● *L. passim*; ● Colonia negativa.

## Capítulo III

**Figura 25.** Curva de rarefacción en las muestras secuenciadas en los dos lotes para su estudio metataxonómico. La gráfica muestra la riqueza de géneros (eje Y) en función del número de secuencias (eje X), con las curvas en azul representando las diferentes muestras. La línea vertical roja marca el valor de 5.123 secuencias, el punto de rarefacción aplicado para todas las muestras.

**Figura 26.** Abundancia relativa de los filos (izquierda) y los géneros bacterianos (derecha) determinados por secuenciación en las diferentes islas.

**Figura 27.** Abundancia relativa de los filos (izquierda) y los géneros bacterianos (derecha) determinados por secuenciación en las muestras procesadas individualmente y colectivas.

**Figura 28.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función de la isla a la que pertenecen. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

**Figura 29.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas de las diferentes islas analizadas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 30.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *V. destructor* en las islas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

**Figura 31.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *V. destructor* en las islas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 32.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *V. destructor* en las islas excluyendo a Terceira del análisis. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 33.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *N. ceranae* en las islas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

**Figura 34.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las islas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 35.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las islas excluyendo a Terceira del análisis. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 36.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las colmenas de las islas donde se encuentra presente. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 37.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *L. passim* en las colmenas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

**Figura 38.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *L. passim* en las colmenas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 39.** Comparación de los valores de diversidad alfa y beta en las muestras colectivas obtenidas en islas con presencia de *N. ceranae* y *L. passim* en función de la presencia (+) y/o ausencia (-) de estos dos parásitos en las colmenas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráfico PCoA basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráfico PCoA basado en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

#### **Capítulo IV**

**Figura 40.** Porcentaje (%) de abejas positivas a cada especie bacteriana en abejas infectadas (naranja) y no infectadas (azul) independientemente de su edad. \* $p < 0,05$ .

**Figura 41.** Abundancia absoluta del gen *ARNr 16S* para las diferentes bacterias intestinales analizadas en abejas infectadas (naranja) y no infectadas (azul). Cuando la distribución de las muestras no permite establecer cajas, los valores se representan mediante círculos. \* $p < 0,05$ .

**Figura 42.** Diagramas de cajas que muestran la abundancia absoluta del número de copias del gen *ARNr 16S* para las diferentes bacterias intestinales analizadas en abejas infectadas por *N. ceranae* (naranja) y no infectadas (azul) a cada edad, ordenadas de mayores a menores diferencias. Cuando la distribución de las muestras no permite establecer casillas, las bacterias se representan mediante círculos. \* $p < 0,05$ .

**Figura 43.** Abundancia absoluta del número de copias del gen *ARNr 16S* de las distintas bacterias intestinales analizadas en abejas de 7 días (izquierda) y 21 días (derecha) infectadas con *N. ceranae* y no infectadas. Cuando la distribución de las

muestras no permite establecer cajas, las bacterias se representan mediante círculos: \*  $p < 0.05$ .

## **TABLAS**

### **Revisión bibliográfica**

**Tabla 1.** Principales taxones bacterianos pertenecientes a la microbiota intestinal de las abejas melíferas.

### **Capítulo I**

**Tabla 2.** Cebadores y sondas empleadas en la detección de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos por las diferentes técnicas de PCR.

**Tabla 3.** Volúmenes de muestra estandarizados en el Laboratorio de Patología Apícola y volúmenes de ADN ajustados tras el ajuste para cada método de extracción para PCR convencional y qPCR para un volumen de reacción final de 25  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

**Tabla 4.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción por PCR convencional.

**Tabla 5.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

**Tabla 6** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *Ba. apis* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

**Tabla 7.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *F. perrara* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

**Tabla 8.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción por PCR convencional.

**Tabla 9.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

**Tabla 10.** Tabla resumen con los recuentos totales de los replicados y muestras positivas para todos los microorganismos analizados en cada método de extracción.

**Tabla 11.** Número de muestras positivas a *N. ceranae* y *L. passim* en el primer análisis y transcurridos 14 meses desde la extracción del ADN por PCR convencional.

**Tabla 12.** Número de muestras positivas a bacterias intestinales, *N. ceranae* y *L. passim* en el primer análisis y transcurridos 14 meses desde la extracción del ADN por qPCR.

## **Capítulo II**

**Tabla 13.** Número de apiarios y colonias muestreados en Madeira y en cada una de las islas del archipiélago de Azores. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.

**Tabla 14.** Cebadores y sondas usadas para la detección de tripanosomátidos por PCR convencional y qPCR. Cebadores: Tryp RPB1 (gen de la *ARN polimerasa I* de la familia Trypanosomatidae); qCmell\_Cytb (gen del *Citocromo b mitocondrial de C. mellificae*); qLpass\_TOPII (gen de la *ADN Topoisomerasa II* de *L. passim*) y qCbom\_RPB1 (gen de la subunidad mayor de la *ARN polimerasa II* de *C. bombi*). F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); +: ácidos nucleicos bloqueados (LNAs).

**Tabla 15.** Número y porcentaje de positivos a tripanosomátidos (+) y negativos (-) en el sedimento y sobrenadante obtenidos de los macerados de abejas de las muestras de Azores 2014-2015.

**Tabla 16.** Porcentaje de cada especie de tripanosomátido detectada por qPCR en las muestras positivas. ND: no detectado. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.

**Tabla 17.** Prevalencia de cada especie de tripanosomátido (%) detectada sola o simultáneamente en cada isla agrupando los datos de todas las técnicas utilizadas (PCR convencional, HTS, qPCR y secuenciación de Sanger). ND: no detectado. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.

**Tabla 18.** Número (y porcentaje) de muestras positivas (+) y negativas (-) a *L. passim* recogidas en 2014-2015 en las Azores en función de si *V. destructor* o *N. ceranae* estaban presentes (+) o no (-).

## **Capítulo III**

**Tabla 19.** Presencia de patógenos en cada una de las islas analizadas en este estudio.

**Tabla 20.** Géneros y especies identificadas en las muestras de Santa María.

**Tabla 21.** Número de colmenas con presencia (+) y ausencia (-) de *N. ceranae* y/o *L. passim*.

#### **Capítulo IV**

**Tabla 22.** Número de abejas infectadas y no infectadas analizadas en cada cohorte de edad.

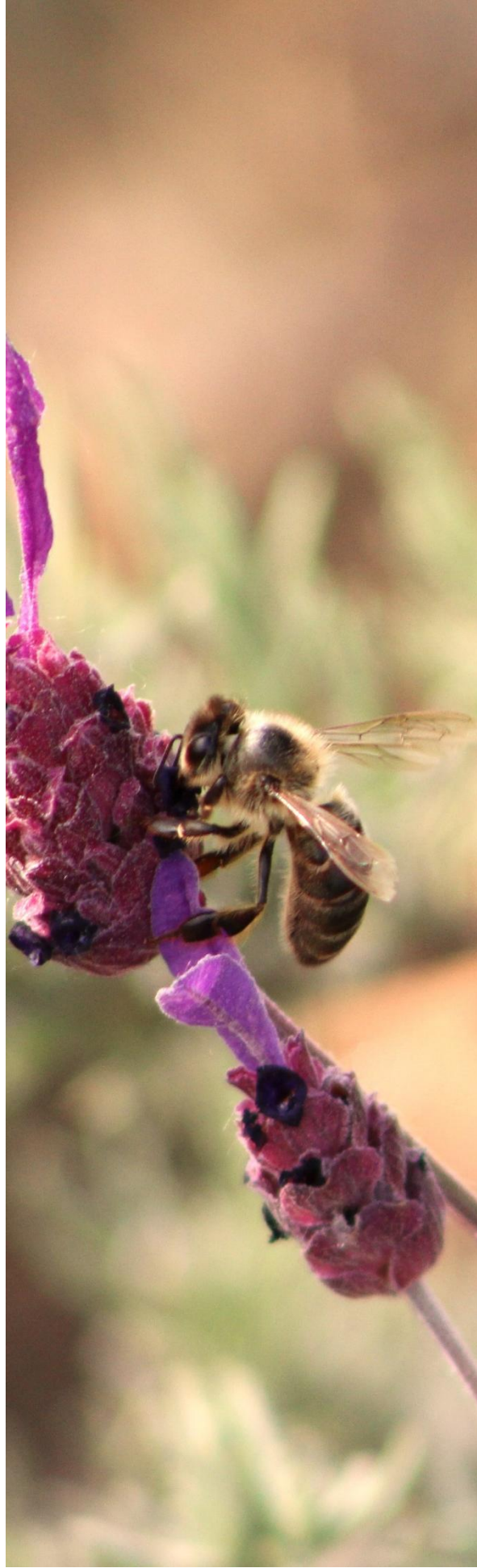
**Tabla 23.** Cebadores y sonda para detectar y cuantificar el gen *ARNr 16S* de *Bo. apis*. F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); +: ácidos nucleicos bloqueados (LNAs).

**Tabla 24.** El fragmento genético *gBlock*® para el gen *ARNr 16S* bacteriano y el gen *COI* de *Apis mellifera*. Las secuencias de los cebadores (rojo) y las sondas (azul) se indican en negrita y subrayadas.

**Tabla 25.** Cebadores utilizados y características de las curvas estándar. LD: límite de detección de los conjuntos de cebadores, expresado como el número más bajo de copias de ADN detectadas cuando se realizaron curvas estándar; Cp: *crossing point* (punto de cruce); F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); pb: pares de bases; Tm: *Melting temperature* (Temperatura de fusión).

**Tabla 26.** Número de abejas incluidas en los análisis estadísticos.

# RESUMEN





## RESUMEN

La abeja melífera (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) es uno de los principales polinizadores de plantas silvestres y cultivos agrícolas en todo el mundo, y además elabora diversos productos ampliamente utilizados por el ser humano (miel, polen, cera, propóleos o veneno de abeja). En las últimas décadas, las poblaciones de estos insectos han experimentado un preocupante descenso a nivel global. Las principales causas son el aumento en el uso de algunos tipos de plaguicidas en zonas de agricultura intensiva, la falta de recursos nutritivos asociada a la pérdida de diversidad floral silvestre debido a la extensión de monocultivos, la fragmentación de ecosistemas, el cambio climático y la acción de diferentes patógenos.

Para contrarrestar estos factores de estrés, las abejas poseen mecanismos sociales e individuales que ofrecen protección frente a las diferentes amenazas para la colonia. Uno de ellos es la microbiota intestinal, la cual no solo contribuye a la digestión y asimilación de nutrientes, sino que también desempeña un papel importante en la mejora de la respuesta inmunitaria y en la protección frente a patógenos. Por tanto, la microbiota intestinal resulta ser un componente determinante en la salud de estos polinizadores. Sin embargo, el estrés ocasionado por los parásitos en el hospedador puede alterar la homeóstasis intestinal y alterar las comunidades bacterianas presentes en el intestino de la abeja.

Dos de los patógenos más ampliamente extendidos a nivel global son el ácaro *Varroa destructor* y el microsporidio *Nosema ceranae*, quedando muy pocas zonas del mundo libres de ellos. La influencia de *V. destructor* en la microbiota intestinal de las abejas aún no está del todo clara al ser un ectoparásito que no tiene contacto directo con las bacterias intestinales. En el caso de *N. ceranae*, un parásito que afecta a las células del intestino medio de la abeja, existe evidencia de que parece modificar la microbiota intestinal pero aún se requiere de más estudios para entender cómo lleva a cabo estas modificaciones. Otro parásito intestinal que en los últimos años se está describiendo en muchas partes del mundo es *Lotmaria passim*, aunque su patogenicidad y su posible influencia en la microbiota intestinal están aún en estudio.

En esta Tesis Doctoral se ha investigado la modulación que se produce en la microbiota intestinal como consecuencia de la acción de estos parásitos, así como algunos factores dependientes tanto del hospedador como del parásito pueden afectar a las poblaciones bacterianas presentes en el intestino de las abejas.

Para llevar a cabo estas investigaciones, en primer lugar, se realizó un estudio en el que se determinó la eficacia de diferentes métodos de extracción de ADN para verificar su idoneidad en el análisis de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos. Dado que gran parte de las muestras utilizadas procedían de ensayos previos, era necesario corroborar la adecuación de estos métodos para llevar a cabo estos análisis. El estudio no sólo ha demostrado que los métodos utilizados en la extracción de dichas muestras son perfectamente válidos, sino que también ha demostrado la necesidad evaluar la idoneidad de cada técnica de extracción para cada tipo de microorganismo a analizar, si se pretende obtener resultados científicos fiables y reproducibles.

Una vez comprobado que las muestras disponibles eran adecuadas para los análisis pertinentes, se llevó a cabo el estudio de abejas de colonias de Madeira y de archipiélago de las Azores. Estas islas se seleccionaron por presentar diversas combinaciones en la presencia de *V. destructor* y *N. ceranae*. Se realizó un estudio para conocer la distribución y la prevalencia de tripanosomátidos en las islas mediante el uso de diferentes técnicas moleculares como la PCR (PCR convencional y qPCR) y técnicas de secuenciación (Alto rendimiento y Sanger). Este estudio reveló que los tripanosomátidos, específicamente *L. passim*, están presentes en todas las islas, incluyendo la que se está libre de *N. ceranae* y *V. destructor*, demostrando que *L. passim* parasita las abejas melíferas desde mucho antes de su descripción.

Una vez conocida la presencia y distribución de *V. destructor*, *N. ceranae* y *L. passim* en las islas Azores, se estudió su influencia en la microbiota intestinal en colonias de abejas ubicadas en diferentes islas con distintas combinaciones de parásitos. Este análisis permitió describir la microbiota intestinal de las abejas que nunca han estado expuestas a *V. destructor* ni a *N. ceranae*, mostrando que su composición bacteriana se encuentra bien conservada con respecto a abejas del resto del mundo que ya han estado

expuestas a estos patógenos. En particular mostraron una abundancia elevada de *Bartonella*, lo cual sugiere que esta bacteria tiene una función importante en estas poblaciones de abejas. Se observó que la presencia de *V. destructor* y *L. passim* aumentó la abundancia de *Bartonella* e influyó principalmente en las bacterias del íleon reduciendo la abundancia de *Snodgrassella*, *Gilliamella* y *Frischella*. *N. ceranae* aumentó la abundancia de estas dos últimas y del género *Lactobacillus*, reduciendo la abundancia de *Snodgrassella*, evidenciando que estos parásitos pueden alterar la microbiota intestinal.

Por último, para estudiar la influencia de factores dependientes del hospedador y del patógeno en la microbiota intestinal, se estudiaron abejas infectadas con *N. ceranae* a distintas edades, en las cuales se determinó la presencia y abundancia de las principales bacterias que forman parte de la microbiota intestinal mediante la técnica de qPCR. Se observó que las abejas infectadas en las primeras 24 horas tras su emergencia mostraron un incremento de la carga bacteriana de prácticamente todas las bacterias intestinales características tras 7 días de infección, mientras que las que se infectaron con 14 días de edad presentaron una disminución en algunas especies bacterianas como *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bartonella apis* y *Bombella apis*. Además, *G. apicola* fue la bacteria más influenciada por la infección, independientemente de la edad de las abejas en el momento de la infección. Este hecho sugiere que podría servir como un marcador de disbiosis intestinal asociado a *N. ceranae* como han propuesto otros autores.

## SUMMARY

The honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) is one of the main pollinators of wild plants and agricultural crops worldwide, as well as producing various products widely used by humans (honey, pollen, wax, propolis and bee venom). In recent decades, bee populations have experienced a worrying decline worldwide. The main causes are the increased use of some types of pesticides in intensive agricultural areas, the lack of food resources associated with the loss of wild floral diversity due to the spread of monocultures, the fragmentation of ecosystems, climate change and the action of different pathogens.

In order to counteract these stressors, honey bees have social and individual mechanisms that provide protection against various threats to the

colony. One of these is the gut microbiota, which not only contributes to the digestion and assimilation of nutrients, but also plays an important role in enhancing the immune response and protection against pathogens. The gut microbiota is therefore a key component in the health of these pollinators. However, stress caused by parasites in the host can disrupt gut homeostasis and alter the bacterial communities present in the bee gut.

Two of the most widespread pathogens worldwide are the *Varroa destructor* mite and the *Nosema ceranae* microsporidium, with very few areas of the world remaining free of them. The influence of *V. destructor* on the gut microbiota of honey bees is still unclear, as it is an ectoparasite that does not have direct contact with gut bacteria. In the case of *N. ceranae*, a parasite that affects cells in the midgut, there is evidence that it appears to alter the gut microbiota, but more studies are needed to understand how it does this. Another gut parasite that has been described in many parts of the world in recent years is the trypanosomatid *Lotmaria passim*, although its pathogenicity and possible influence on the gut microbiota are still under investigation.

In this PhD thesis, the modulation of the gut microbiota as a consequence of the action of these parasites was investigated, as well as how some host- and parasite-dependent factors can affect the bacterial populations present in the honey bee gut.

To carry out this research, a study was firstly performed to determine the effectiveness of different DNA extraction methods to verify their suitability for the analysis of gut bacteria, microsporidia and trypanosomatids. As a large proportion of the samples used were from previous studies, it was necessary to confirm the suitability of these methods for carrying out these analyses. The study has not only shown that the methods used to extract these samples are perfectly valid, but has also demonstrated the need to evaluate the suitability of each extraction technique for each type of microorganism to be analysed if reliable and reproducible scientific results are to be obtained.

Once the available samples were considered suitable for analysis, bees from colonies in Madeira and the Azores archipelago were studied. These islands were chosen because they have different combinations of *V. destructor* and *N. ceranae* occurrence. A study was carried out to determine the distribution and prevalence of trypanosomatids on the islands using different

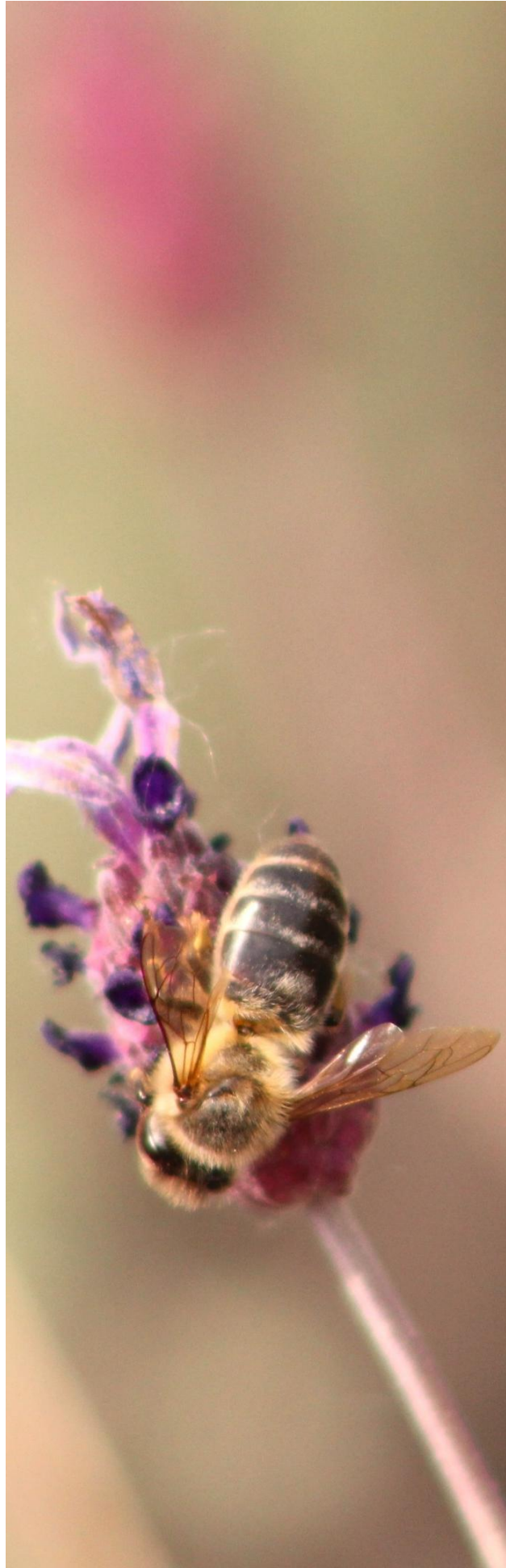
molecular techniques such as PCR (conventional PCR and qPCR) and sequencing techniques (high-throughput and Sanger). This study showed that trypanosomatids, especially *L. passim*, are present on all islands, including the one free of *N. ceranae* and *V. destructor*, demonstrating that *L. passim* parasitised honey bees long before its description.

Once the presence and distribution of *V. destructor*, *N. ceranae* and *L. passim* in the Azores were known, their influence on the gut microbiota was studied in bee colonies from different islands with different combinations of parasites. This analysis allowed us to describe the gut microbiota of bees that had never been exposed to *V. destructor* and *N. ceranae*, showing that their bacterial composition was well conserved compared to bees from the rest of the world that had been exposed to these pathogens. They showed a high abundance of *Bartonella*, suggesting that this bacterium plays an important role in these bee populations. It was observed that the presence of *V. destructor* and *L. passim* increased the abundance of *Bartonella* and mainly affected the ileum bacteria by reducing the abundance of *Snodgrassella*, *Gilliamella* and *Frischella*. *N. ceranae* increased the abundance of the latter two and of the genus *Lactobacillus* and reduced the abundance of *Snodgrassella*, showing that these parasites can alter the honey bee gut microbiota.

Finally, to study the influence of host- and pathogen-dependent factors on the gut microbiota, bees infected with *N. ceranae* at different ages were studied and the presence and abundance of key gut microbiota bacteria were determined by qPCR. It was observed that honey bees infected within the first 24 hours after emergence showed an increase in the bacterial load of almost all characteristic gut bacteria after 7 days of infection, while those infected at 14 days of age showed a decrease in some bacterial species such as *Bombilactobacillus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bartonella apis* and *Bombella apis*. Furthermore, *G. apicola* was the bacterium most affected by the infection, regardless of the age of the bees at the time of infection. This fact suggests that it could serve as a marker of intestinal dysbiosis associated with *N. ceranae*, as suggested by other authors.

## Resumen

# INTRODUCCIÓN GENERAL





La abeja melífera (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) es la especie de abeja más ampliamente distribuida a nivel global debido a su gran adaptabilidad y productividad. Su importancia en los ecosistemas terrestres es crucial, ya que desempeña un papel fundamental en la polinización de plantas silvestres y aquellas destinadas a la producción de alimentos en todo el mundo. De hecho, se estima que el 70% de los cultivos tropicales (Roubik 1995) y el 85% de los cultivos en Europa (Williams 1994) que producen alimentos para consumo humano y animal dependen de los polinizadores. También es un productor directo de alimentos para consumo humano, como la miel y la jalea real, además de otros productos como los propóleos, el polen o el veneno de abeja (apitoxina). Todo ello, hace que *A. mellifera* sea una especie clave en el equilibrio natural de los ecosistemas, en la conservación de la biodiversidad silvestre y en la preservación de la producción primaria global.

El valor económico de la polinización en la agricultura, junto con los productos derivados de la apicultura, se estima en unos 153 billones de euros al año a nivel mundial (Gallai *et al.* 2009). En España, según el Plan Nacional de Conservación de Polinizadores, el valor anual de la polinización está estimado en 2.400 millones de euros, de los cuales, 62 millones corresponden exclusivamente a la producción de miel, cera y polen según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En cuanto al censo de colmenas, según el Registro general de explotaciones ganaderas (REGA), a fecha de marzo de 2024 el número de colmenas censadas fue de 2.803.668 colmenas, de las cuales el 80% pertenecen a apicultores profesionales, lo que pone de manifiesto la importancia del sector apícola español en las actividades ganaderas.

Por tanto, es fundamental garantizar la viabilidad de las colonias de abejas mediante la conservación y mantenimiento del estado sanitario de las mismas. Sin embargo, en las últimas décadas, las poblaciones de abejas han sufrido pérdidas anuales alarmantes (vanEngelsdorp y Meixner 2010; Hristov *et al.* 2020) resultado de una combinación de factores bióticos y abióticos que pueden actuar tanto de forma aislada como sinérgica. Entre estos factores se encuentran la exposición a numerosos plaguicidas como consecuencia del aumento de la agricultura intensiva y la contaminación ambiental, la pérdida de diversidad de flora silvestre debido al incremento de monocultivos, la fragmentación de los ecosistemas, el cambio climático y el aumento en la prevalencia de parásitos y patógenos (Le Conte y Navajas 2008; Higes *et al.*

2010; Rosenkranz, Aumeier y Ziegelmann 2010; Goulson *et al.* 2015; Cavigli *et al.* 2016).

Las abejas, para hacer frente a todos estos factores de estrés, cuentan con mecanismos tanto sociales como individuales que le permiten hacer frente a las diversas amenazas para ellas y para la colonia. Uno de ellos es la microbiota intestinal, que desempeña un papel crucial en su salud, contribuyendo a la digestión del alimento, reforzando sistema inmunitario y brindando protección frente a parásitos (Engel, Martinson y Moran 2012; Schwarz, Huang y Evans 2015; Steele *et al.* 2021). No obstante, el estrés ocasionado por los parásitos puede alterar la homeóstasis intestinal y modular las poblaciones bacterianas presentes en el intestino de las abejas.

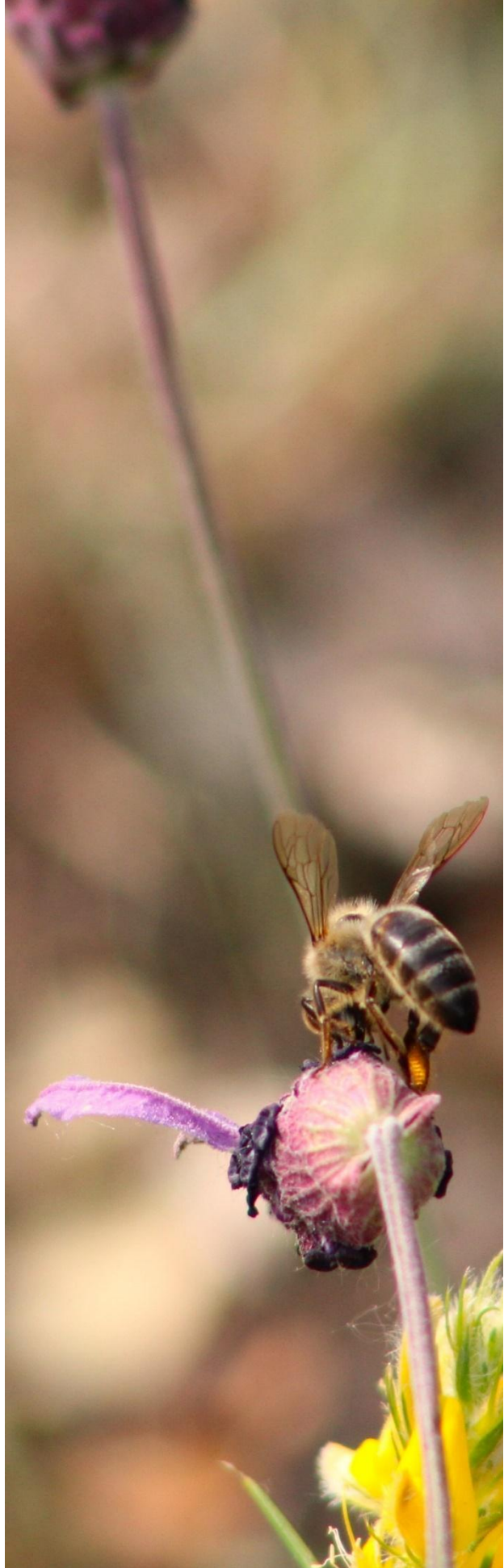
Entre los patógenos más extendidos a nivel mundial se encuentran el ácaro *Varroa destructor* y el microsporidio *Nosema ceranae*, con muy pocas regiones del planeta que permanecen libres de ellos. Otro parásito que en los últimos años se ha descrito en muchas localizaciones del planeta es el tripanosomátido *Lotmaria passim*, pero su patogenicidad no está del todo clara. La influencia del ácaro en la microbiota intestinal aún no se ha estudiado en detalle ya que, al ser un ectoparásito, no interactúa directamente con las bacterias intestinales. Sin embargo, *N. ceranae* y *L. passim* son parásitos intestinales del intestino medio y posterior, respectivamente y, por tanto, tienen contacto directo con las bacterias intestinales. En el caso del microsporidio existe evidencia de que parece influir en la microbiota intestinal (Hubert *et al.* 2017; Rubanov *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2019; Naree *et al.* 2022); sin embargo, aún se requiere de más estudios para entender cómo lleva a cabo dichas estas modificaciones. En cuanto al tripanosomátido, aún no se ha estudiado en detalle su influencia en la microbiota intestinal de las abejas. Por tanto, aún quedan muchos aspectos por esclarecer sobre las interacciones entre la microbiota intestinal y los parásitos que afectan a las abejas melíferas.

En este contexto, esta memoria de Tesis Doctoral presenta una revisión bibliográfica actualizada sobre los avances de las últimas décadas en el estudio de la microbiota intestinal de las abejas. Esta revisión abarca aspectos como la composición y distribución de las comunidades bacterianas en el intestino, los mecanismos de adquisición y la evolución en su composición a lo largo de la vida de la abeja, así como los factores que pueden

alterarla, prestando especial atención a la influencia de parásitos. Además, se incluye información detallada sobre la epidemiología y la patogenicidad microsporidios, tripanosomátidos y *V. destructor* y los efectos reportados hasta la fecha en la microbiota intestinal de las abejas. A continuación, se presentan en cuatro capítulos los estudios realizados, finalizando con una discusión general y las conclusiones obtenidas en ellos. Al final de la memoria se adjuntan las publicaciones científicas generadas a lo largo de esta investigación y los congresos nacionales e internacionales en los que se han presentado los resultados obtenidos.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## Revisión Bibliográfica

## 1. MICROBIOTA Y EVOLUCIÓN DE SU ESTUDIO

Desde nuestro origen evolutivo, los seres vivos hemos estado expuestos de forma constante a los microorganismos, dando lugar a interacciones que han fomentado el desarrollo de relaciones simbióticas entre el microorganismo y sus hospedadores. Estas interacciones han resultado ser un importante motor para la diversificación y la evolución de los seres vivos.

El cuerpo de los animales ofrece una amplia variedad de nichos ecológicos, en los que las condiciones ambientales como la temperatura, el pH y el nivel de oxígeno, así como la disponibilidad de nutrientes, afectan a la composición de los microorganismos que residen en ellos (Ikeda-Ohtsubo *et al.* 2018). Al conjunto de estos microorganismos que habitan en los diferentes tejidos del hospedador se les conoce con el nombre de microbiota y abarca desde interacciones mutualistas a parasitarias (Simon *et al.* 2019). El término microbioma aún es objeto de debate en cuanto a su definición ya que en unas ocasiones se considera únicamente al conjunto de ácidos nucleicos derivados de la microbiota de un nicho específico mientras que en otras se incluye tanto a los propios microorganismos, sus ácidos nucleicos y sus metabolitos (Berg *et al.* 2020).

Es tal la importancia de las interacciones entre hospedador y sus microorganismos que, en 1991, Lynn Margulis introdujo el término "holobionte" e inicialmente se refería a una entidad biológica simple en la que participaban un hospedador y un único simbionte hereditario. Este término se amplió para definir a un hospedador y a las comunidades de microorganismos asociadas a él y así es como se entiende actualmente. Así pues, un hospedador y su microbiota constituyen un holobionte y ambos evolucionan de forma conjunta para adaptarse a los factores ambientales y hacen frente a los peligros que pueden poner en riesgo su salud (Simon *et al.* 2019). De la misma manera, el concepto de patobioma surgió para describir a los patógenos que conviven en el ambiente microbiano dentro del hospedador (Vayssier-Taussat *et al.* 2014).

Los estudios sobre hospedadores y su microbiota se han centrado mayoritariamente en el tracto gastrointestinal, puesto que es el lugar donde se encuentran las poblaciones de microorganismos más densas y diversas (Kostic, Howitt y Garrett 2013). Debido a su localización recibe el nombre de

microbiota intestinal y está formada principalmente por bacterias, además de virus, arqueas, protozoos, mohos y levaduras. Entre las diversas funciones que desempeñan en todos los animales, se ha visto que está involucrada en procesos tan importantes del hospedador como son el desarrollo, el metabolismo, la digestión del alimento, la resistencia a patógenos y a la modulación del sistema inmunitario. No obstante, hoy en día, aún se desconocen muchas de las funciones que podría desempeñar y de las interacciones entre la propia microbiota y su hospedador (Koskella, Hall y Metcalf 2017; Adair y Douglas 2017).

En las últimas décadas, el estudio de la microbiota intestinal ha cobrado especial importancia debido al impacto que tiene en la salud del hospedador. Esto ha permitido comprender características fundamentales de los microorganismos intestinales y descubrir mecanismos no caracterizados hasta el momento y que podrían ayudar a desarrollar tratamientos clínicos en beneficio de la salud humana y animal.

### **1.1. Insectos**

Los insectos son, con diferencia, el clado animal más diverso y abundante, tanto en número de especies a escala mundial como en hábitats ecológicos y en biomasa (Grimaldi y Engel 2005; Basset *et al.* 2012). La diversificación y adaptación a diferentes ecosistemas que ha marcado su éxito evolutivo ha dependido, en gran parte, de las innumerables relaciones simbióticas con microorganismos beneficiosos (Bourtzis y Miller 2003; Zchori-Fein y Bourtzis 2011). Aunque la mayoría de los insectos poseen una microbiota inestable o inespecífica que está representada por microorganismos ambientales (Martinson, Moy y Moran 2012; Engel, Martinson y Moran 2012), estudios realizados en especies eusociales, como las abejas, muestran una coevolución de los hospedadores con su microbiota a lo largo del tiempo (Kwong y Moran 2015; Kwong *et al.* 2017).

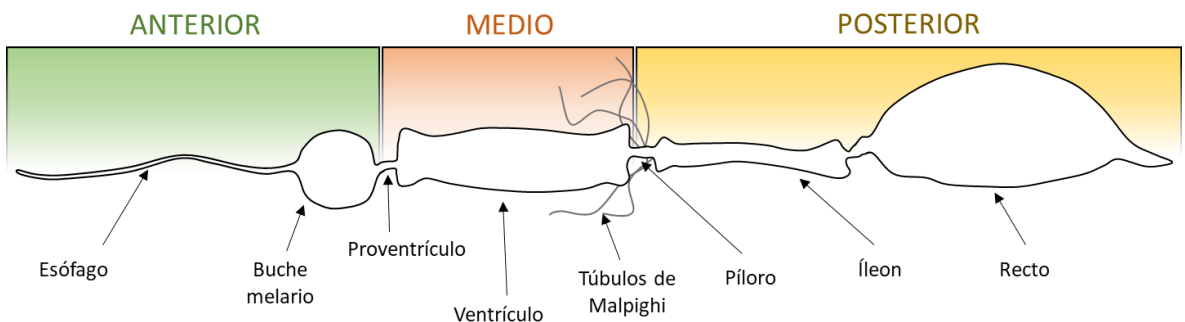
De hecho, en los últimos años, se ha observado que las abejas melíferas adultas tienen una comunidad bacteriana intestinal característica que desempeña diversas funciones para la fisiología, ecología y evolución del hospedador (Hamdi *et al.* 2011) y que, además, está conservada en las diferentes subespecies de abejas a lo largo de todo el mundo independientemente de la distribución geográfica o de la subespecie del

hospedador (Jeyaprakash, Hoy y Allsopp 2003; Mohr y Tebbe 2006; Kwong *et al.* 2017). También se han detectado comunidades bacterianas en otras localizaciones anatómicas como las glándulas hipofaríngeas (Corby-Harris *et al.* 2014) o en las corbículas (Anderson *et al.* 2014), aunque sea han estudiado muy poco. En cualquier caso, la mayoría de las bacterias del cuerpo de una abeja se localizan en su aparato digestivo (Subotic *et al.* 2019).

Por tanto, el estudio de la microbiota intestinal de las abejas abre camino hacia un mayor conocimiento de las interacciones microbiota-hospedador y a la posibilidad de desarrollar tratamientos para preservar la salud de las colonias que hagan frente al aumento de la mortalidad observada en las últimas décadas.

## 2. APARATO DIGESTIVO DE LAS ABEJAS

La estructura básica del tracto digestivo es similar en todos los insectos, aunque posee una diversidad de modificaciones asociadas a la adaptación a diferentes modos de alimentación. Las abejas son insectos holometábolos que realizan una metamorfosis completa por lo que el aparato digestivo no queda desarrollado en su totalidad hasta que no alcanzan la etapa adulta. Una vez desarrollado, el tracto digestivo de una abeja adulta se diferencia en tres regiones principales: intestino anterior, intestino medio (o ventrículo) e intestino posterior (Chapman, 1998; **Figura 1**).



**Figura 1.** Representación esquemática del aparato digestivo de las abejas melíferas adultas y sus principales partes. Fuente: original.

El **intestino anterior** y posterior se originan a partir del ectodermo embrionario y están recubiertos por un exoesqueleto formada por quitina y

glicoproteínas cuticulares. Este exoesqueleto separa el lumen intestinal de las células epidérmicas (Engel y Moran 2013b).

El intestino anterior está formado por la boca que posee cuatro pares de glándulas (Snodgrass 1984):

- Dos pares de glándulas salivales (dos post-cerebrales y dos torácicas) que desempeñan un papel crucial en la secreción salivar, contribuyendo a la lubricación del alimento y la dilución de los azúcares que posee.
- Dos glándulas mandibulares, las cuales, en el caso de las obreras, son responsables de la segregación del componente graso del alimento destinado a las larvas, mientras que en la reina segregan las feromonas que permiten su reconocimiento por parte de las obreras (Morse y Hooper 1985; Dade 1994).
- Dos glándulas hipofaríngeas, cuyo mayor desarrollado se produce en las abejas nodrizas, y realizan la biosíntesis de proteínas que permite la secreción de jalea real para alimentar a las larvas. En las abejas pecoreadoras, según avanza su edad, estas glándulas se atrofian y su actividad secretora disminuye. En estas abejas, se incrementa la actividad de la sacarasa y el metabolismo del almidón, procesos importantes para la transformación del néctar en miel (Hu *et al.* 2019).

Tras la boca, el digestivo anterior continúa con el esófago, un tubo muscular largo y estrecho que comunica la boca con el buche melario, zona donde el esófago se dilata y se almacena el néctar recogido durante la pecorea para posteriormente transportarlo a la colmena. El proventrículo es una válvula que separa el buche con el ventrículo y es la última parte del intestino anterior.

El **intestino medio** se compone exclusivamente del ventrículo, que es el principal lugar de digestión del alimento y absorción de nutrientes, principalmente de azúcares simples y aminoácidos (Snodgrass 1984; Crailsheim 1988; 1990; Chapman 1998; Terra *et al.* 2019). El ventrículo es un tubo largo y ancho, rodeado por músculos que, al contraerse, facilitan el paso del alimento hacia la zona distal. Además, las células epiteliales que lo revisten

poseen glándulas secretoras que producen enzimas digestivas, contribuyendo a la digestión del alimento (Dade 1994). Este revestimiento tiene un origen de desarrollo diferente al del intestino anterior y posterior, ya que se origina a partir de células endodérmicas (Gillott 1995) por lo que no posee el exoesqueleto que sí aparece en el intestino anterior y posterior.

Sin embargo, las células epiteliales del intestino medio, al igual que en otros insectos, generan una envoltura conocida como matriz peritrófica (o membranas peritróficas), que suele renovarse continuamente a medida que se desprende y que divide el intestino medio en el espacio endo y ectoperitrófico (Terra 2001). La matriz peritrófica desempeña diversas funciones, como proporcionar una barrera que protege al epitelio de los daños mecánicos provocados por las partículas alimentarias, de la exposición a grandes moléculas de toxinas presentes en los alimentos y de la invasión microbiana, y también concentrar los alimentos y las enzimas digestivas (Lehane y Billingsley 1996; Shao, Devenport y Jacobs-Lorena 2001; Wang *et al.* 2012). Además, está salpicada de pequeños poros que permiten el paso de enzimas y pequeñas moléculas procedentes del alimento ingerido (iones inorgánicos, azúcares simples, aminoácidos, pequeñas proteínas, péptidos, etc.), pero es una barrera eficaz frente a lípidos, proteínas grandes, polisacáridos y microorganismos patógenos (Chapman 1998; Erlandson, Toprak y Hegedus 2019; Teixeira *et al.* 2019), que suelen quedar confinados en el espacio endoperitrófico impidiendo el contacto directo con el epitelio del intestino (Terra 2001).

A continuación del ventrículo, se encuentra el **intestino posterior** que tiene tres partes diferenciadas: el píloro, el íleon y el recto. El píloro es la zona de transición del intestino medio al posterior y actúa como esfínter, controlando el paso del alimento del intestino medio al intestino posterior e impidiendo su reflujo. Además, es el lugar donde desembocan de los túbulos de Malpighi en el intestino y, por tanto, la zona en la que se mezclan el alimento y las secreciones de los túbulos de Malpighi (Engel y Moran 2013b). El píloro continúa con el íleon, un tubo estrecho formado por seis pliegues longitudinales que se proyectan en su lumen (Snodgrass 1984) que aumentan la superficie de absorción de los nutrientes y del agua (Santos y Serrão 2006). El recto o ampolla rectal es la última parte del aparato digestivo de la abeja. Aunque en su mayor parte es de paredes finas, el recto incluye de seis a ocho almohadillas rectales cuya función es absorber iones, agua y pequeñas

moléculas orgánicas y mantener la presión osmótica (Gillott 1995; Chapman 1998). Esta zona tiene la capacidad de distenderse y retener las heces hasta la defecación (Snodgrass 1984), propiedad realmente útil durante el invierno ya que las obreras no defecan en el interior de la colonia y tienden a acumular las heces hasta que pueden salir al exterior. La parte distal del recto se estrecha y termina en el ano.

### 3. MICROBIOTA INTESTINAL BACTERIANA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

El intestino de las abejas adultas está dominado por 5-10 taxones bacterianos estrechamente relacionados y que comprenden entre el 95% y el 99% de las bacterias en la gran mayoría de los individuos según estudios metagenómicos del gen *ARNr 16S* (Martinson *et al.* 2011; Engel, Martinson y Moran 2012; Moran *et al.* 2012; Corby-Harris, Maes y Anderson 2014; Bleau *et al.* 2020a; Su *et al.* 2022). Entre estos taxones, cinco de ellos son considerados troncales y se encuentran en todas las abejas de las diferentes regiones geográficas del mundo. Sin embargo, los otros cinco (no troncales) se encuentran presentes en casi todas las colonias de abejas, pero no en todos los individuos de estas.

En un principio, algunas de las bacterias intestinales de las abejas eran nombradas acorde a su filo, y en algunos casos por la clase a la que pertenecían. Por tanto, en la bibliografía podemos encontrar nomenclaturas como Alpha-1, Alpha-2.1 y Alpha-2.2 en el caso de las Alphaproteobacterias; Beta-1 para las Betaproteobacterias; Gamma-1 y Gamma-2 para las Gammaproteobacterias; *Lactobacillus* Firm-4 y Firm-5 para los Firmicutes (ahora Bacillota). En el caso de los Actinomycetes, *Bifidobacterium asteroides* fue de las primeras especies bacterianas identificada en el intestino de las abejas melíferas (Scardovi y Trovatelli 1969; Biavati *et al.* 2000).

Posteriormente, con los avances tecnológicos y el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, se fueron caracterizando los géneros y especies bacterianas que pertenecían a esos taxones. Así, dentro de Alpha-1 se identificó la bacteria *Bartonella apis* (Kešnerová, Moritz y Engel 2016), mientras que en Alpha-2.1 se encuentra *Commensalibacter* spp. y en Alpha-2.2 las especies *Parasacharibacter apium* y *Bombella* spp. (Fuller 1989). Por otro lado, en Beta-1 se

identificó *Snodgrassella alvi*, en Gamma-1 *Gilliamella apicola* (Kwong y Moran 2013), y en Gamma-2 *Frischella perrara* (Engel *et al.*, 2013). En cuanto al filo Bacillota, se caracterizaron diversas especies del género *Lactobacillus* del aparato digestivo de las abejas (Olofsson *et al.* 2014; Killer *et al.* 2014). En el taxón conocido como Firm-4, se identificaron las especies *Lactobacillus mellifer* y *Lactobacillus mellis*, mientras que en el taxón Firm-5 se identificaron las especies *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus kimbladii*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus kullabergensis* y *Lactobacillus apis*. Además, otra especie del filo Bacillota, *Lactobacillus kunkeei*, se identificó en el intestino de las abejas (Endo *et al.* 2012) y, aunque es genéticamente diferente de los dos taxones anteriores, está más asociada a los Firm-4.

Los últimos estudios genéticos han revelado la necesidad de actualizar la taxonomía de algunas de las especies bacterianas que forman estos taxones y han propiciado ajustes en la nomenclatura para reflejar de manera más precisa la diversidad genética de las bacterias intestinales de las abejas. Estas especies bacterianas intestinales, con su nomenclatura actual, se pueden encontrar en la **Tabla 1**.

<b>Troncales</b>				
Filo	Clase	Orden	Familia	Género / Especie
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	<i>Gilliamella apicola</i>
Pseudomonadota	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Snodgrassella alvi</i>
Actinomycetota	Actinomycetes	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium spp.</i>
Bacillota	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Bombilactobacillus spp.</i>
Bacillota	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus spp.</i>
<b>No troncales</b>				
Filo	Clase	Orden	Familia	Especie
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	Orbales	Orbaceae	<i>Frischella perrara</i>
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiales	Bartonellaceae	<i>Bartonella apis</i>
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Bombella apis</i>
Pseudomonadota	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Commensalibacter spp.</i>
Bacillota	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>

**Tabla 1.** Principales taxones bacterianos pertenecientes a la microbiota intestinal de las abejas melíferas.

Actualmente, *Bo. apis* engloba las especies bacterianas antes conocidas como *P. apium*, *Bo. apis* y especies del género *Saccharibacter*, estas últimas aisladas del polen, miel e intestino de las abejas (Jojima *et al.* 2004; Smith y Newton 2020). En cuanto a los *Lactobacillus*, el antiguo taxón de los Firm-4 ahora se denomina *Bombilactobacillus* y el de *L. kunkeei*, *Apilactobacillus* (Zheng *et al.* 2020).

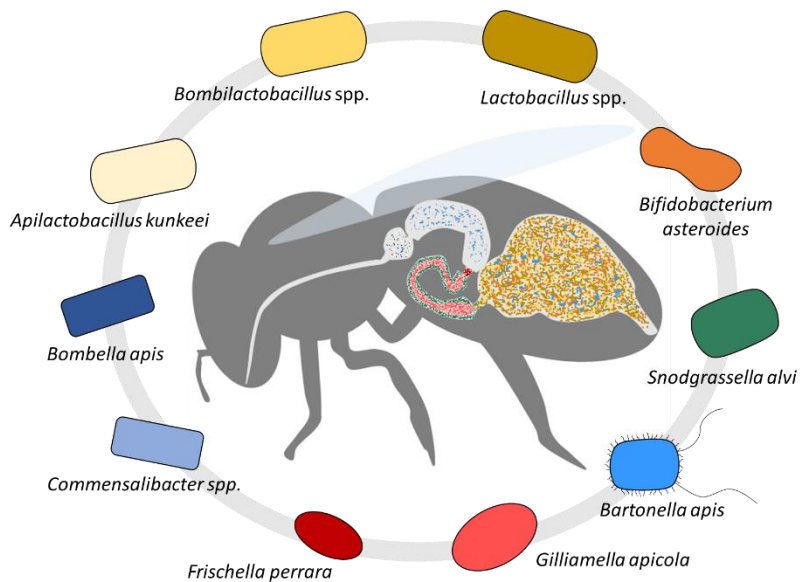
Todas estas especies bacterianas se distribuyen de manera diferencial a lo largo del tracto digestivo de la abeja (**Figura 2**) debido a su particular adaptación a los diferentes nichos metabólicos que ofrece cada una de las regiones intestinales anteriormente mencionadas.

En el buche melario son pocas las especies bacterianas que se encuentran en esta localización predominando *A. kunkeei* y *Bo. apis*, que también se encuentran en el néctar y en los materiales de la colmena ya que pueden vivir en concentraciones de oxígeno atmosféricas (Anderson *et al.* 2013; 2014; Corby-Harris *et al.* 2014).

Al igual que en el buche melario, en el ventrículo también hay pocas bacterias ya que, debido al desprendimiento continuo de la matriz peritrófica, no ofrece un sustrato estable para la colonización bacteriana (Engel y Moran 2013b). Las especies encontradas en el intestino medio se reducen a *Ba. apis* y, en la zona más distal ya cercana al intestino posterior, *G. apicola* (Ludvigsen *et al.* 2015; Ricigliano *et al.* 2017).

En cambio, el intestino posterior alberga prácticamente la totalidad de las comunidades bacterianas intestinales (entre  $10^8$  y  $10^9$  células bacterianas) que representan más del 99% de la microbiota bacteriana intestinal de las abejas obreras adultas (Martinson, Moy y Moran 2012). El íleon está dominado por tres especies bacterianas: *F. perrara*, *G. apicola* y *S. alvi*. La primera, cuando está presente, se localiza junto a la pared intestinal en el píloro (Engel, Bartlett y Moran 2015). Las otras dos especies se distribuyen en el lumen de los pliegues del íleon formando una capa estructurada o biopelícula. En esta biopelícula, *S. alvi* se encuentra directamente sobre la superficie del epitelio intestinal, mientras que *G. apicola* se sitúa sobre ella formando una segunda capa orientada hacia la luz intestinal (Martinson, Moy y Moran 2012; Powell *et al.* 2016). El recto está dominado por bacterias pertenecientes a los géneros *Bombilactobacillus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y en menor proporción

*Commensalibacter* (Anderson *et al.* 2013; Powell *et al.* 2014; Maes *et al.* 2016; Anderson y Ricigliano 2017).



**Figura 2.** Representación esquemática de la distribución en el aparato de digestivo de las principales especies bacterianas intestinales de las abejas melíferas adultas. Fuente: original, inspirada en Bonilla-Rosso *et al.* (2018).

Una vez que se ha establecido en el intestino en las abejas adultas, la composición de la microbiota experimenta cambios mínimos en lo que respecta a diversidad bacteriana, a pesar de las fluctuaciones estacionales, cambios en la dieta, alteraciones del comportamiento y cambios en la expresión génica que se producen cuando las obreras pasan de ser abejas nodrizas a pecoreadoras. No obstante, sí se producen variaciones en la abundancia de las diferentes especies bacterianas.

### 3.1. Especificidad de la microbiota a su especie hospedadora

Además de las abejas melíferas, otras especies de abejas corbiculadas (*Apis* spp., *Bombus* spp. y abejas sin aguijón) también albergan comunidades microbianas intestinales estables compuestas por muchos de los mismos grupos de especies bacterianas (Kwong *et al.* 2017). En cambio, hasta ahora no se ha determinado si las abejas solitarias y las abejas sociales no corbiculadas albergan esta comunidad bacteriana particular (Mcfrederick *et al.* 2014;

Voulgari-Kokota *et al.* 2019; Li *et al.* 2023). Curiosamente, los cinco taxones principales del intestino de *A. mellifera* también se han encontrado en los géneros *Bombus* y *Apis* (Koch y Schmid-Hempel 2011; Martinson *et al.* 2011; Li, Yiyuan *et al.* 2022; Koch *et al.* 2013). Una especie bacteriana del filo *Bacteroidota*, *Apibacter adventoris* (Kwong y Moran 2016a), también se ha encontrado tanto en obreras del género *Apis* como del *Bombus*, aunque su presencia en *A. mellifera* es muy ocasional. Otros taxones, sin embargo, parecen estar más restringidos al hospedador, como en el caso de *Ba. apis* y *F. perrara*, las cuales sólo se han identificado en especies pertenecientes al género *Apis* (Kwong *et al.* 2017).

Por otro lado, cada especie de abeja puede albergar diferentes cepas bacterianas de cada especie. Además, las especies hospedadoras emparentadas tienden a albergar cepas bacterianas similares, lo que sugiere una codiversificación y una coadaptación a lo largo de grandes escalas de tiempo evolutivas (Ellegaard *et al.* 2020; Steele y Moran 2021; Li, Yiyuan *et al.* 2022). Esta especificidad puede verse reforzada por la incapacidad de las cepas bacterianas intestinales de cruzar las fronteras de los hospedadores, ya que se ha visto que, al inocular abejorros con cepas bacterianas aisladas de abejas, éstas no logran establecerse en el intestino de los abejorros, y viceversa (Kwong *et al.* 2014; Kwong y Moran 2015). Además, las especies troncales no han sido halladas en ningún otro entorno aparte del intestino de abejas, debido probablemente a que son principalmente microaerófilas o anaerobias facultativas y no pueden vivir mucho tiempo en concentraciones atmosféricas de oxígeno (Engel y Moran 2013a). Por todo ello, el comportamiento social y el contacto con las superficies de la colmena son factores importantes para su transmisión entre hospedadores de la misma especie.

### **3.2. Funciones de la microbiota intestinal**

La microbiota de las abejas melíferas desempeña muchas funciones cruciales en el hospedador, entre las cuales podemos encontrar las de favorecer la digestión de los alimentos (Kešnerová *et al.* 2017; Zheng *et al.* 2019; Li, Chenyi *et al.* 2022), mejorar la respuesta inmunitaria frente a patógenos y parásitos (Engel, Martinson y Moran 2012; Schwarz, Huang y Evans 2015; Steele *et al.* 2021), potenciar el desarrollo del hospedador modulando la vía de señalización endocrina que regula el comportamiento alimentario y el aumento de peso (Zheng *et al.* 2017a; Jones *et al.* 2018) e incluso se ha visto que tienen

la capacidad de detoxificar algunos plaguicidas (Wu *et al.* 2020) y de degradar microplásticos como el poliestireno (Wang *et al.* 2021).

Gracias a la secuenciación de los genomas de las especies bacterianas principales que componen la microbiota intestinal de las abejas, se han deducido las posibles funciones de estas bacterias por sus características genéticas. Por ejemplo, cuatro de ellas (*G. apicola*, *Bifidobacterium* spp., *Bombilactobacillus* spp. y *Lactobacillus* spp.), a pesar de poseer genomas pequeños que han perdido ciertas funciones metabólicas básicas, conservan gran parte de los genes dedicados al metabolismo de los carbohidratos (Engel y Moran 2013a; Kwong, Mancenido y Moran 2014; Kwong *et al.* 2014; Ellegaard *et al.* 2015). También se ha observado que poseen genes que codifican para realizar el ciclo completo del citrato, lo que sugiere que la fermentación es la actividad metabólica predominante en el intestino de las abejas. Por otro lado, *S. alvi* parece carecer de genes esenciales para la glucólisis, pero posee genes implicados en una ruta alternativa del citrato que está optimizado para la utilización de acetato como sustrato lo que sugiere un nicho metabólico diferente (Kwong *et al.* 2014). Además, *Bifidobacterium* spp. posee genes implicados en la biosíntesis de trehalosa, disacárido que funciona como fuente de energía en las abejas (Ellegaard *et al.* 2015). El análisis genético de *Commensalibacter* spp. (anteriormente Alpha 2.1) y *Bo. apis* (Alpha 2.2) reveló que, a pesar de pertenecer a la misma familia, poseen diferencias genéticas importantes en los genes implicados en el metabolismo del carbono y respiración celular (Fuller 1989), de tal manera que *Bo. apis* posee genes que permiten realizar la fermentación oxidativa y *Commensalibacter* spp. no. Asimismo, entre estas diferencias, *Bo. apis* parece haber perdido el ciclo del citrato, por lo que se especula que está especializada en la utilización rápida de recursos mediante la oxidación incompleta de los carbohidratos, lo que reduce su rango metabólico a diferencia de *Commensalibacter* spp. Por último, *Ba. apis* posee genes implicados en la degradación de metabolitos secundarios presentes en el néctar y el polen para la producción de energía y aminoácidos (Segers *et al.* 2017). Por tanto, las propiedades genéticas de las bacterias intestinales reflejan estilos de vida asociados al hospedador adaptándose a su dieta rica en carbohidratos (principalmente sacarosa, glucosa y fructosa de la miel y néctar) y a la colonización de nichos espaciales y metabólicos diferentes (Li, Chenyi *et al.* 2022).

El polen, otra fuente fundamental de alimento en la dieta de las abejas, constituye el principal aporte de proteínas, lípidos, micronutrientes como vitaminas y minerales, además de carbohidratos complejos (Wright, Nicolson y Shafir 2018). El consumo de polen ocurre principalmente durante las etapas larvarias y en los primeros estadios de adultas, desempeñando un papel esencial en el crecimiento, el desarrollo y los procesos reproductivos de las abejas melíferas (Danner *et al.* 2017), siendo especialmente importante para el correcto desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y de la grasa corporal de las obreras recién emergidas (Hoover y Ovinge 2018).

Actualmente, poco se conoce sobre la degradación del polen en el intestino, aunque sí hay evidencia de que ocurre principalmente en el intestino posterior. Las observaciones del polen tomado de las distintas zonas del intestino indican que los granos de polen que se encuentran en la parte anterior del ventrículo muestran pocos signos de digestión, conservando un color fresco y manteniendo su contenido intacto (Snodgrass 1984; Klungness y Peng 1984a; 1984b; Crailsheim *et al.* 1992). A medida que los granos de polen avanzan por el ventrículo, empiezan a mostrar una hinchazón inicial y los poros de germinación algo más delgados y, algunos de ellos liberando parte de su contenido a través de los poros en la parte más distal del ventrículo (Klungness y Peng 1984a; 1984b; Peng, Nasr y Marston 1986; Crailsheim *et al.* 1992). En contraste, el polen encontrado en el recto ha perdido su color brillante y la mayoría de los granos se encuentran vacíos o con un contenido muy reducido y con la pared del polen degradada (Snodgrass 1984; Klungness y Peng 1984a; 1984b; Crailsheim *et al.* 1992).

Gracias a experimentos *in vitro*, se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene influencia en ese proceso de digestión del polen. De hecho, *G. apicola* tiene la capacidad de degradar la pectina, un polisacárido principal de la pared interna (intina) del polen (Zheng *et al.* 2016). Además, también se ha comprobado que las bacterias intestinales pueden utilizar compuestos aromáticos (flavonoides, fenolamidas), nucleósidos, ácidos carboxílicos y  $\omega$ -hidroxiácidos que forman parte de la pared exterior del polen (exina) como sustrato de fermentación (Kešnerová *et al.* 2017). Las altas concentraciones de ácidos orgánicos (acetato, succinato y propionato) encontrados en el íleon y recto de abejas confirman lo que ya se había deducido a partir de los estudios genéticos, que la fermentación es la principal actividad metabólica de las

bacterias intestinales. El acetato es uno de los principales productos de fermentación de *G. apicola* y, como se ha mencionado anteriormente, la bacteria microaerófila *S. alvi*, posee un ciclo alternativo del citrato en el que utiliza como sustrato el acetato (Kwong, Zheng y Moran 2017). Por tanto, se establece una relación en la que el producto de la fermentación de *G. apicola* es utilizado en la respiración de *S. alvi* y, de esta forma, la biopelícula que forman permite mantener las condiciones de anaerobiosis en el íleon que favorecerá los procesos fermentativos de los compuestos del alimento (Kwong *et al.* 2014).

Otros sustratos derivados del polen susceptibles a la fermentación son los compuestos aromáticos de la exina como los flavonoides, fenolaminas y  $\omega$ -hidroxiácidos, que pueden representar hasta el 4% del peso seco del polen (Kešnerová *et al.* 2017). En el cultivo de simbiontes intestinales *in vitro* se ha observado que los flavonoides glicosilados disminuyen, mientras que las agliconas (desglicosilados) aumentan. En este proceso, el azúcar se separa y es fermentado, posteriormente se produce la descomposición del polifenol. Dado que los flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, su potencial está vinculado a su estado de glicosilación (Xiao 2017) por lo que la degradación y bioconversión de estos compuestos podría tener relación con la homeostasis intestinal y la resistencia a la colonización por patógenos.

En el recto, las bacterias del género *Lactobacillus* son las principales utilizadoras de flavonoides. Además, *Bidifobacterium asteroides*, principal especie de bifidobacteria en el intestino de las abejas, junto con las especies de *Bombilactobacillus* spp., utilizan como sustrato las fenolamidas y los  $\omega$ -hidroxiácidos derivados de la cubierta del polen tras su degradación en el íleon. Esto parece desencadenar la producción de prostaglandinas y derivados de la hormona juvenil por parte de *B. asteroides*, que tienen funciones clave en la inmunidad y la fisiología del hospedador (Kešnerová *et al.* 2017).

Otra bacteria que parece tener efecto sobre la inmunidad de las abejas es *F. perrara*. Esta bacteria considerada no troncal desencadena una respuesta inmunitaria innata del hospedador provocando la formación de una costra de melanina en la superficie epitelial del píloro (Engel, Bartlett y Moran 2015). Esta melanización suele asociarse a daños en los tejidos y a la invasión por un

patógeno (Kwong y Moran 2016b), por lo que en ocasiones se refiere a ella como un posible patógeno oportunista. El papel funcional y el mecanismo por el cual se produce esta costra son aún desconocidos; sin embargo, la amplia distribución de esta bacteria en las poblaciones de abejas melíferas de todo el mundo sugiere que esta inmunomodulación específica podría ser relevante para la salud y la enfermedad de las abejas (Emery, Schmidt y Engel 2017).

Además, se ha observado que la apidaecina y la himenoptaecina, dos péptidos antimicrobianos que se encuentran en la hemolinfa de las abejas tras un desafío inmunitario, ven aumentada su expresión cuando las abejas poseen su microbiota intestinal característica (Kwong, Mancenido y Moran 2017), lo que refuerza la hipótesis de que las bacterias intestinales inducen respuestas inmunitarias en las abejas.

La microbiota intestinal de las abejas también ejerce una influencia en la neurofisiología de estos insectos. Se ha observado que las bacterias intestinales desempeñan un papel clave en la regulación de los comportamientos sociales de las abejas, generando cambios en la expresión génica y promoviendo una mayor abundancia de metabolitos en el cerebro asociados a la percepción de estímulos olfativos y gustativos (Liberti *et al.* 2022). Además, parece mejorar su capacidad de memorización y aprendizaje (Cabirol *et al.* 2023).

Por otra parte, las abejas están expuestas a una amplia variedad de xenobióticos como los pesticidas y se ha descrito que la microbiota intestinal contribuye a la detoxificación endógena de la abeja y a la resistencia de neonicotinoides, como el tiacloprid y el fluvalinato, promoviendo la expresión de enzimas de desintoxicación (Wu *et al.* 2020).

### **3.3. Adquisición de la microbiota intestinal en obreras**

Como se ha mencionado anteriormente, las abejas son insectos holometábolos con estadios larvarios, pupales y adultos diferenciados. Durante la fase larvaria, las obreras desempeñan un papel crucial al alimentar a las larvas, primero con jalea real y posteriormente con una mezcla de miel, néctar y polen. Estas interacciones alimentarias facilitan el intercambio de bacterias, lo que resulta en la acumulación de bacterias intestinales propias de abejas adultas en el intestino de las larvas (Vojvodic, Rehan y Anderson 2013). La diversidad de las comunidades bacterianas en las larvas también parece estar

influenciada por la edad de estas. En los primeros estadios larvarios, se observa un predominio de *Bo. apis*, mientras que en los estadios más avanzados se identifican *Bo. apis*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *A. kunkewi* y *S. alvi* (Vojvodic, Rehan y Anderson 2013; Kowallik y Mikheyev 2021). A diferencia de los adultos, las larvas tienen un intestino discontinuo en el que el intestino anterior (buche) e intestino medio no está conectado con el intestino posterior (íleon y recto) hasta justo antes de la pupación. Es en este momento cuando las larvas excretan por primera vez los residuos de la alimentación (Snodgrass 1984).

Durante el proceso de pupación, se produce una remodelación del intestino, entre otros órganos, en la que se produce un desprendimiento del revestimiento exoesquelético del intestino larvario anterior y posterior. Este revestimiento se elimina en forma de meconio, alterando e incluso eliminando casi por completo cualquier población bacteriana adherida en el intestino (Engel y Moran 2013b). Tras finalizar la metamorfosis, en el interior de la celda operculada se encuentra una abeja adulta con el intestino prácticamente libre de bacterias (Martinson, Moy y Moran 2012).

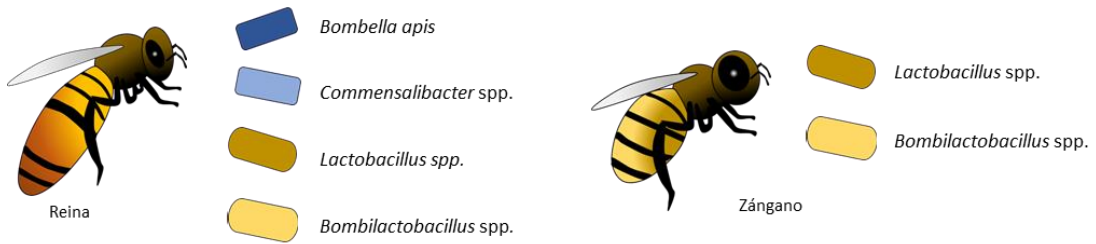
Al emerger, la nueva obrera inicia su incorporación al entorno de la colmena y se inicia la adquisición de bacterias al roer el opérculo y limpiar su propia celdilla. En este proceso empieza a adquirir ciertas bacterias que se encontraban en la superficie del opérculo y, posteriormente, al entrar en contacto con el material de la colmena (cera, polen, pan de abeja, etc.), continúa incorporando microorganismos a su intestino (Johnson 2010; Koch *et al.* 2013; Powell *et al.* 2014; Onchuru *et al.* 2018). En los primeros días, la comunidad bacteriana intestinal de las obreras es reducida y no presenta diferenciación entre las regiones del intestino. A partir del tercer día aproximadamente, el intestino de las abejas contiene más de  $10^7$  bacterias, siendo ya en su mayoría las especies características de la microbiota intestinal descritas anteriormente (Anderson *et al.* 2016). Estas comunidades bacterianas se empiezan a estabilizarse en torno a las  $10^9$  bacterias al séptimo día tras la emergencia. Una vez establecidas, tienden a mantenerse generalmente estables a lo largo de las diferentes fases que se desarrollan dentro de la colmena (Kapheim *et al.*, 2015). Esta estabilidad se observa antes de que las obreras salgan de la colmena (Hroncova *et al.* 2015), lo que hace suponer que el contacto con las estructuras de la colmena y las interacciones entre individuos

dentro de la misma son importantes para la transmisión de las bacterias intestinales entre los miembros de la colonia (Powell *et al.* 2014).

Entre esas interacciones se encuentran las tareas de aseo de otras abejas, limpieza de la colonia o el intercambio de alimento mediante la trofalaxis. Sin embargo, estudios recientes han revelado que estos comportamientos sociales influyen en menor medida en la transmisión de bacterias (Anderson *et al.* 2016; 2023). Por el contrario, la ruta fecal-oral parece ser la vía de adquisición más importante, especialmente para *S. alvi*, *G. apicola* y *F. perrara* (Powell *et al.* 2014; Anderson *et al.* 2016), aunque los demás miembros de la microbiota intestinal característica también pueden adquirirse por contacto con los componentes de la colmena que han estado expuestos a contaminación fecal reciente. Las especies *Bo. apis* y *A. kunkelii* podrían transmitirse a través del polen almacenado y los propóleos (Anderson *et al.* 2014; Dalenberg *et al.* 2020).

### **3.4. Microbiota intestinal de las castas reproductivas**

El perfil de las comunidades bacterianas intestinales de las reinas adultas y de los zánganos presentan diferencias notables con respecto al de las obreras. En el caso de las reinas, su microbiota es variable en cuanto a composición en comparación con las obreras, predominando las especies *Bo. apis*, *Commensalibacter* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bombilactobacillus* spp., careciendo prácticamente del resto de las especies bacterianas distintivas del intestino de las obreras (Tarpy, Mattila y Newton 2015; Kapheim *et al.* 2015; Powell *et al.* 2018; Yun *et al.* 2018). Estas diferencias se deben muy probablemente a las diferencias en la fisiología y en la alimentación, ya que las reinas se alimentan exclusivamente de jalea real. En relación con los zánganos, su microbiota destaca por una abundancia considerablemente mayor de *Bombilactobacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. (Kapheim *et al.* 2015; Hroncova *et al.* 2015). Aunque las razones de estas diferencias en los zánganos aún no están del todo claras, podrían estar relacionadas con su falta de participación en las tareas realizadas por las obreras. No obstante, su contacto con ellas y con el entorno de la colmena les permite compartir ciertas bacterias.



**Figura 3.** Bacterias intestinales predominantes en las castas reproductivas.

### 3.5. Factores influyentes en la microbiota intestinal

Como ya se ha mencionado anteriormente, la composición de la microbiota intestinal de las abejas adultas es estable a partir del séptimo día tras la emergencia. Sin embargo, existen ciertos factores que hacen que haya una variabilidad en la abundancia de las comunidades bacterianas troncales, tanto a nivel individual como a nivel de la colonia. Entre ellas, podemos diferenciar la edad de la abeja, la estación del año y la nutrición.

Aunque de forma general la microbiota de las obreras está bien caracterizada, puede existir mucha variabilidad en la abundancia de las bacterias troncales incluso en abejas de la misma edad y de la misma colmena (Moran *et al.* 2012; Powell *et al.* 2014; Kapheim *et al.* 2015).

En líneas generales, se ha observado que tanto bacterias troncales como no troncales colonizan primero el íleon y posteriormente el recto en el transcurso de 2 días tras la emergencia (Powell *et al.* 2014). A esta fase inicial de colonización le sigue un rápido establecimiento de los taxones troncales entre los 4 y 6 días tras la emergencia, mostrándose diferenciación entre las partes del intestino a partir del tercer día de edad.

En el primer día tras la emergencia, el intestino está dominado por especies bacterianas no características de la microbiota intestinal de las abejas (Powell *et al.*, 2014) y por especies del género *Lactobacillus* (Cai *et al.* 2022). Las especies *G. apicola*, *S. alvi*, *F. perrara* y *Bo. apis* comienzan a colonizar el intestino de las abejas especialmente a partir del segundo día tras la emergencia (Powell *et al.* 2014; Dong *et al.* 2020; Cai *et al.* 2022). Esto se debe principalmente al cambio en la dieta que experimentan las abejas tras su emergencia, comenzando a consumir grandes cantidades de polen (Toth *et al.* 2005; Toth y Robinson 2005). Además, también contribuye el cambio de entorno en el que

van a desarrollarse, dado que hasta el momento han pasado su vida dentro de la celdilla (Dong *et al.* 2020).

Entre el primer y el tercer días tras la emergencia, las principales tareas de las obreras incluyen la limpieza de las celdillas, el cuidado y la alimentación de la cría y de la reina (Seeley 1982). Durante este periodo, la abundancia de las especies de *Commensalibacter* spp., *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. también comienza a aumentar (Martinson, Moy y Moran 2012; Guo *et al.* 2015; Anderson *et al.* 2016; Dong *et al.* 2020). Como ya se ha señalado previamente, estas bacterias son de gran ayuda para la absorción de nutrientes y la protección de las abejas. Además, una mayor abundancia de *Bifidobacterium* spp. podría ser un indicador de desarrollo de las obreras, gracias a la estimulación de la producción de metabolitos del hospedador como prostaglandinas y derivados de la hormona juvenil, que como se ha mencionado anteriormente, tienen un papel clave en la inmunidad y la fisiología de las abejas.

En los días posteriores, entre el cuarto y duodécimo día tras emerger, las tareas de las abejas cambian, centrándose en la alimentación de otras abejas de la colonia, la ventilación de la colmena y la formación del panal (Seeley 1982; Crailsheim *et al.* 1992). En este punto, la abundancia de las bacterias intestinales se mantiene estable, metabolizando la variedad de compuestos procedentes de la dieta de la abeja y proporcionando muchos nutrientes y energía que garantizan la realización efectiva de las tareas en esta etapa (Dong *et al.* 2020).

Entre los días decimotercero y vigesimoprimeros tras la emergencia, las abejas se encargan de la recepción del polen y del néctar que traen las pecoreadoras del exterior de la colmena, transformándolos en pan de abeja y miel, respectivamente, para su almacenamiento (Seeley 1982). En este punto parece que la abundancia de *A. kunkkei* aumenta, debido principalmente a la entrada de alimento externo ya que es una bacteria asociada a muchas flores (Endo *et al.* 2012; McFrederick *et al.* 2012; Neveling, Endo y Dicks 2012) y, además, es encontrada en una proporción elevada, junto con *Bo. apis*, en el polen almacenado (Anderson *et al.* 2013; 2014; Dong *et al.* 2020). Estas bacterias también están asociadas a ambientes ácidos como la miel y la jalea real (Vojvodic, Rehan y Anderson 2013; Corby-Harris *et al.* 2014) por lo que

se piensa que podrían desempeñar papeles clave en el almacenamiento de alimentos y la salud de las larvas (Anderson *et al.* 2013; Corby-Harris *et al.* 2014).

A partir del día vigesimoprimeros, las obreras empiezan a salir de la colmena realizando inicialmente tareas de defensa de la colmena y, posteriormente, de pecorea en busca de néctar, polen, propóleos y agua (Seeley 1982). Durante este periodo, se ha observado una disminución de la abundancia de bacterias pertenecientes a Gammaproteobacteria (*G. apicola* y *F. perrara*), *Bifidobacterium* spp. y Bacillota (Hroncova *et al.* 2015; Rothman *et al.* 2018; Dong *et al.* 2020). Esto se debe a que estas abejas más viejas apenas consumen polen y se alimentan exclusivamente de miel y néctar, alimentos ricos en carbohidratos que les aportarán la energía necesaria para el vuelo (Corby-Harris, Maes y Anderson 2014).

Otro factor que influye en la microbiota intestinal es la estación del año (Kwong y Moran 2016b; Jabal-Uriel *et al.* 2022a). La actividad de las abejas está estrechamente relacionada con la disponibilidad de los recursos florales, por lo que los cambios producidos en las comunidades bacterianas muy probablemente se deban a los cambios de floración que se dan a lo largo del año (Subotic *et al.* 2019). La primavera marca el inicio de la floración y, desde este momento hasta el otoño, es el periodo de tiempo en el que las pecoreadoras tienen una mayor actividad, coincidiendo con un aumento en la abundancia de *G. apicola* (Ludvigsen *et al.* 2015). Durante el otoño, las abejas empiezan a prepararse para la invernada y las nuevas obreras que nacen se denominan abejas de invierno, que tienen una esperanza de vida más larga (de 3 a 6 meses) frente a los 25-35 días de las abejas estivales (Winston 1991; Amdam y Omholt 2002; Döke, Frazier y Grozinger 2015; Kunc *et al.* 2019). Estas abejas desempeñan un papel crucial para asegurar la supervivencia de la colonia durante el invierno en ausencia de cría. En esta época, entre los meses de septiembre y noviembre, se observa un aumento de la abundancia de *S. alvi* (Bleau *et al.* 2020b), aunque las diferencias entre las pecoreadoras de primavera y el otoño son mínimas (Corby-Harris, Maes y Anderson 2014). No obstante, también se ha observado una mayor abundancia de *S. alvi* en primavera en comparación con el otoño, aunque en este caso se tratara de abejas del interior de la colmena (Jabal-Uriel *et al.* 2022a).

Cuando llega la temporada fría, las abejas se agrupan en el interior de la colmena y no salen de ella para conservar el calor y mantener una temperatura adecuada, alimentándose de las reservas acumuladas (pan de abeja y miel) que han recolectado durante la primavera y el otoño. Además, retienen sus heces durante el invierno, lo que repercute en la microbiota intestinal, haciendo que las abejas de invierno alberguen una comunidad bacteriana más abundante en comparación con las abejas estivales (Kešnerová *et al.* 2020), con niveles más altos principalmente de *Commensalibacter* spp. y *Ba. apis*.

En regiones tropicales y subtropicales, donde las variaciones estacionales son menos pronunciadas y las abejas emergen constantemente a lo largo del año, las nodrizas muestran una mayor diversidad bacteriana en primavera y menor en verano e invierno. Sin embargo, en primavera dominan los *Bombilactobacillus* spp. y *Lactobacillus* spp.; mientras que en verano e invierno *G. apicola* y *S. alvi* son las más abundantes (Castelli *et al.* 2022).

Uno de los factores más importantes, tanto para el buen desarrollo de las abejas como el de su microbiota intestinal, es la alimentación (Wang *et al.* 2020; Saelao *et al.* 2020). La calidad de la nutrición de las abejas se caracteriza por una alimentación rica en nutrientes obtenidos de una amplia variedad de recursos florales. Sin embargo, los efectos del cambio climático y de las prácticas actuales del uso de la tierra centradas en monocultivos provocan una pérdida muy significativa de la diversidad floral en muchas zonas del planeta (Neov *et al.* 2019; Villagomez *et al.* 2021). Esto determina que las colonias de abejas melíferas a menudo se encuentran en entornos que carecen de la diversidad de polen adecuada o con un valor nutritivo bajo, lo que aumenta el consumo de polen almacenado para hacer frente a la escasez de nutrientes (Di Pasquale *et al.* 2016).

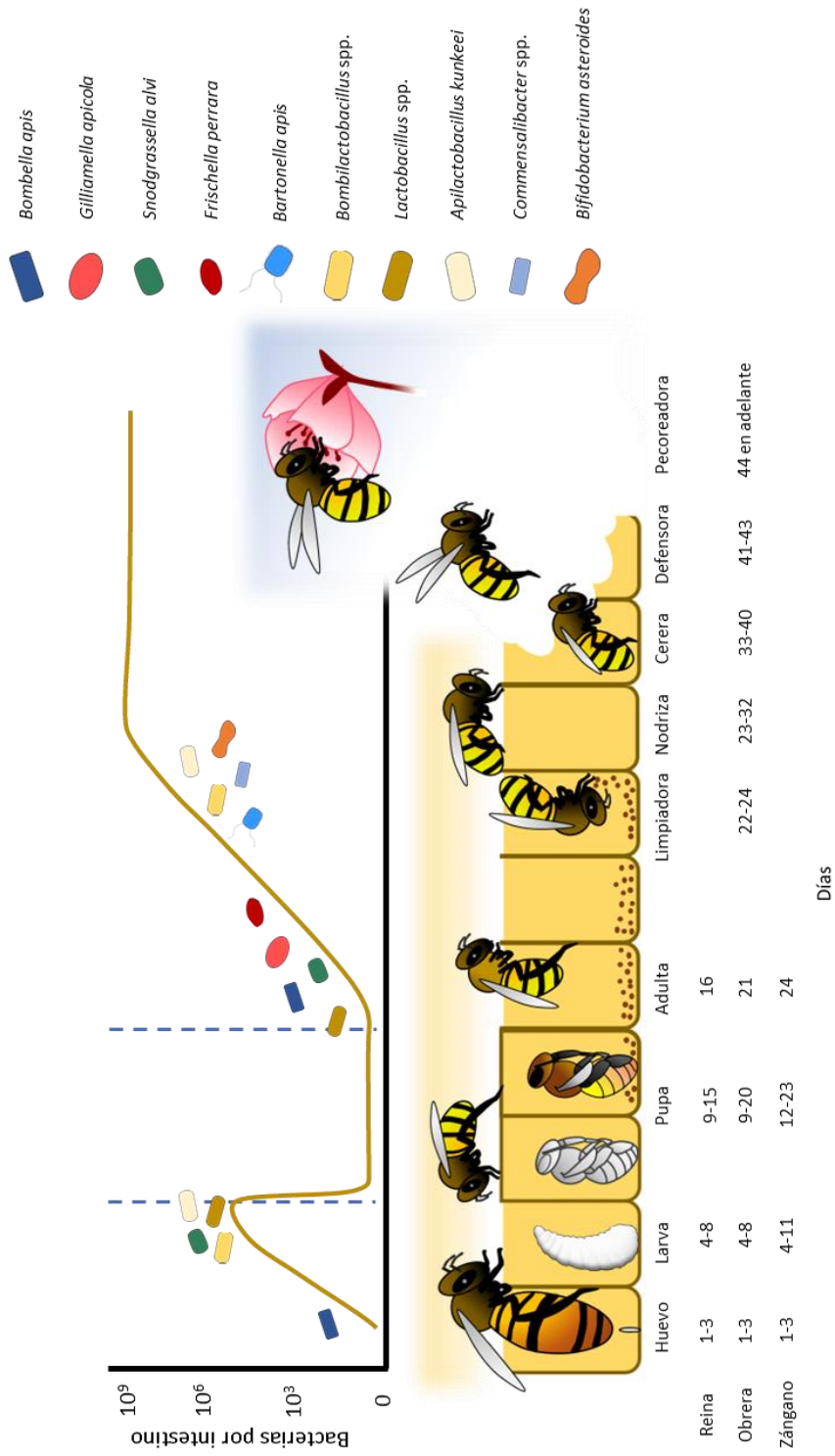
Adicionalmente, se ha demostrado que una alimentación a base de polen de baja calidad nutricional, con menor porcentaje de proteínas, bajo contenido en lípidos y ausencia de algunos aminoácidos esenciales, puede ocasionar un estrés nutricional a las abejas (Invernizzi *et al.* 2011; Branchiccela *et al.* 2019), produciendo alteraciones en la microbiota intestinal y favoreciendo el desarrollo de patógenos (Castelli *et al.* 2020). Además, se ha asociado directamente con una disminución de la cría y de la población general de

abejas, lo que contribuye a una mayor pérdida de colonias (Branchiccela *et al.* 2019).

Por otro lado, inicialmente se pensaba que el valor nutritivo del polen almacenado aumentaba con el tiempo (Anderson *et al.* 2014), pero estudios recientes han revelado que las obreras jóvenes que consumen dietas envejecidas experimentan alteraciones en el tórax, glándulas hipofaríngeas y en los músculos de vuelo, que se traducen en un pecoreo ineficaz en las etapas adultas; así como alteraciones en la microbiota intestinal, llevando consigo a un aumento en la mortalidad (Maes *et al.* 2016).

Además, cuando la alimentación de las abejas se reduce a polen monofloral de baja calidad, las comunidades bacterianas se ven modificadas, aumentando la abundancia de la bacteria *Ba. apis*. En contraste, cuando la alimentación es a base de polen multifloral, la abundancia de las especies como *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. aumenta (Castelli *et al.* 2020). De nuevo, una mayor abundancia de estas últimas especies con una alimentación de alto valor nutritivo parece convertirlas en un marcador del estado de salud de las abejas asociado a una microbiota sana.

Este conjunto de hallazgos pone de manifiesto la necesidad de emplazar las colmenas en entornos que les aseguren el acceso a diversidad floral que le proporcione los múltiples nutrientes que necesitan para mantener una microbiota sana, mejorando así la viabilidad de las abejas y de la colonia.



**Figura 4.** Ciclo biológico de las abejas melíferas y cambios asociados a la microbiota intestinal de las obreras. Fuente: original.

### 3.6. Microbiota intestinal no bacteriana

El intestino de la abeja melífera también alberga otros microorganismos como hongos, levaduras y virus, a los cuales hasta hace unos años no se les han dedicado tantos estudios en comparación con los realizados sobre el componente bacteriano de la microbiota de las abejas melíferas (Ludvigsen *et al.* 2015; Callegari *et al.* 2021).

Aunque hay pocos estudios, se conoce que las poblaciones fúngicas no son tan abundantes como las bacterianas en el intestino del hospedador, pero sí desempeñan un papel en la homeostasis intestinal estableciendo interacciones espaciales y tróficas entre los microorganismos del intestino y ofreciendo un apoyo nutricional esencial para el hospedador al proporcionar enzimas, aminoácidos esenciales y vitaminas (Stefanini 2018; Tauber *et al.* 2019). Además, estas poblaciones fúngicas persisten en el intestino de las abejas tras su desarrollo metamórfico, aunque en frecuencias muy bajas, siendo predominante levaduras del género *Saccharomyces* (Yun *et al.* 2018; Tauber *et al.* 2019).

Al igual que las poblaciones bacterianas, los hongos y las levaduras también poseen una compartimentalización a lo largo del tracto digestivo de la abeja adulta (Callegari *et al.* 2021). El buche melario alberga una mayor variedad de comunidades fúngicas en comparación con los demás compartimentos del intestino. En el buche se han identificado diversos géneros fúngicos como *Hanseniaspora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Malassezia*, *Starmerella* y *Candida*. No obstante, la abundancia de *Cladosporium*, *Penicillium*, *Candida* y *Malassezia* se reduce a lo largo del tracto intestinal, siendo *Hanseniaspora* y *Starmerella* las especies predominantes en el intestino medio, el íleon y el recto.

Además, en función de la subespecie de abejas, se ha observado que existen diferencias en las especies de levaduras. Por ejemplo, en la subespecie de abejas *Apis mellifera ligústica*, especies de los géneros *Hanseniaspora* y *Starmerella* parecen ser predominantes en los compartimentos del intestino medio, íleon y recto. Sin embargo, en la subespecie de abejas *A. mellifera jemenitica*, no se observa la presencia de estas especies, pero se han identificado especies del género *Zygosaccharomyces* como las predominantes (Callegari *et al.* 2021).

Otro grupo de microorganismos de los que se han realizado muy pocos estudios son los bacteriófagos o fagos, virus que infectan bacterias, y que han demostrado ser importantes agentes de cambio en las especies bacterianas intestinales. En los pocos estudios existentes acerca de estos organismos en abejas (Bonilla-Rosso *et al.* 2020; Deboutte *et al.* 2020), se ha podido observar una gran diversidad de fagos, que abarcan diferentes taxones virales, y que están dirigidos a las principales especies bacterianas de la microbiota intestinal, infectando principalmente a bacterias de los géneros *Bifidobacterium*, *Bombilactobacillus*, *Lactobacillus* y *Gilliamella*, aunque también se han encontrado en menor proporción en *F. perrara*, *S. alvi* y *Commensalibacter spp.*

Sin embargo, cómo afectan exactamente a las bacterias que son infectadas aún se desconoce. Se han identificado múltiples genes metabólicos que podrían poseer el potencial de intervenir en rutas metabólicas como el metabolismo energético y el metabolismo de los carbohidratos (Bonilla-Rosso *et al.* 2020; Deboutte *et al.* 2020). Además, también podrían estar involucradas en la formación de biopelículas y en la capacidad de movimiento en respuesta a estímulos químicos (quimiotaxis) y, por tanto, interferir en los procesos microbianos a nivel de población bacteriana. Adicionalmente, se han descubierto cuatro grupos de genes de bacteriocinas, lo que hace suponer que tienen el potencial de ejercer un efecto sobre otras bacterias del mismo ecosistema en el intestino de las abejas. Por tanto, la comunidad viral posee un potencial papel en el intestino y el metabolismo microbiano y, por tanto, podrían influir en el desarrollo, la salud y la homeostasis intestinal de las abejas.

## **4. PARÁSITOS INTESTINALES DE LAS ABEJAS**

Además de los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal de las abejas melíferas, podemos encontrar también parásitos que se alojan en el tracto digestivo donde desempeñan su acción patógena. En esta revisión nos centramos en los microsporidios y en los tripanosomátidos por su prevalencia y patogenicidad.

### **4.1. Microsporidios**

Dada la mayor importancia sanitaria de *Nosema ceranae*, esta revisión bibliográfica se centra en esta especie, haciendo también referencia a las diferencias principales con *Nosema apis*.

#### 4.1.1. Principales especies de microsporidios en abejas melíferas

Los microsporidios son microorganismos eucariotas intracelulares, parásitos obligados y formadores de esporas pertenecientes al Orden Microsporidia. Son capaces de infectar prácticamente todos los filos y clases de vertebrados e invertebrados (Wittnet y Weiss 1999; Weiss 2003; Han y Weiss 2017). Su clasificación taxonómica ha sido objeto de debate, ya que en un principio se consideraron protozoos hasta que en el año 2005 fueron reclasificados e introducidos en el reino Fungi (Adl *et al.* 2005). Sin embargo, los últimos estudios filogenéticos han hecho que se clasifiquen como una rama divergente de los Fungi (Bass *et al.* 2018).

Actualmente, se conocen tres especies que infectan a *A. mellifera*: *Nosema apis* (Zander 1909), *Nosema ceranae* (Higes, Martín-Hernández y Meana 2006) y *Nosema neumannii* (Chemurot *et al.* 2017). Esta última especie fue identificada en abejas de Uganda, y se posee muy poca información sobre su área de distribución, aunque aparentemente su presencia se limita a África. Sin embargo, las dos primeras especies, se encuentran extendidas por todo el planeta y su acción patógena está muy bien descrita, produciendo las enfermedades conocidas como nosemosis tipo A y tipo C, respectivamente (Higes, Martín-Hernández y Meana 2010). Cada una de ellas presenta un cuadro clínico diferente, que afecta de forma desigual a la viabilidad de las colonias que, en función de su frecuencia y grado de patogenicidad, tienen consecuencias para la viabilidad de las colonias (revisado por Martín-Hernández *et al.* 2018). Adicionalmente, se ha descrito una cuarta especie, *Nosema thomsoni*, en abejas melíferas de España y Japón (Bartolomé *et al.* 2020; Takashima, Ohari y Itagaki 2021), pero se desconoce si causa infección en estos insectos.

*N. apis* se describió por primera vez en *A. mellifera* a principios del siglo XX y era considerada la única especie que infectaba a las abejas melíferas (Zander 1909). A finales del siglo XX, se descubrió *N. ceranae* en la abeja asiática *A. cerana*, concretamente en China, por lo que se piensa que esta especie podría ser el hospedador original y que coevolucionó con ella (Fries *et al.* 1996) pero la realidad es que se desconoce cuál es el hospedador original de *N. ceranae*. Posteriormente, esta especie fue descrita en colonias de *A. mellifera* en España (Higes, Martín-Hernández y Meana 2006) y Taiwán (Huang *et al.*

2007), siendo asociada en el primer caso a pérdidas masivas de colonias de abejas.

En análisis retrospectivos realizados a partir de este momento, se detectó en Estados Unidos, China, Vietnam, Brasil y varios países de Europa (Cox-Foster *et al.* 2007; Klee *et al.* 2007; Martín-Hernández *et al.* 2007; Paxton *et al.* 2007). Además, el análisis de muestras de abejas recientes e históricas revelaron que *N. ceranae* tenía un rango geográfico y de hospedadores muy amplio, expandido desde décadas anteriores a sus primeras detecciones en Europa, Asia y América (Fries *et al.* 1996; Higes, Martín-Hernández y Meana 2006; Cox-Foster *et al.* 2007; Huang *et al.* 2007).

En las últimas décadas, *N. ceranae* ha sido detectada en países geográficamente distantes como Australia (Giersch *et al.* 2009), Japón (Yoshiyama y Kimura 2011), Chile (Martínez, Leal y Conget 2012), Jordania (Haddad 2014), Arabia Saudí (Ansari *et al.* 2017), o Siberia (Tokarev *et al.* 2018). También se ha encontrado en otras especies de abejas melíferas como *Apis florea*, *Apis dorsata* y *Apis koschevnikovi* (Chaimanee, Warrit y Chantawannakul 2010; Botías *et al.* 2012). Además, diferentes estudios sugieren que *N. ceranae* ha podido saltar a través de otras especies, incluyendo especies de los géneros *Bombus* (abejorros), *Osmia* (abejas solitarias albañiles), *Andrena* (abejas solitarias de la arena) y *Melipona*, *Tetragonisca* y *Scaptotrigona* (abejas sociales sin aguijón) aumentando de esta manera su impacto en las poblaciones de polinizadores (Martín-Hernández *et al.* 2018).

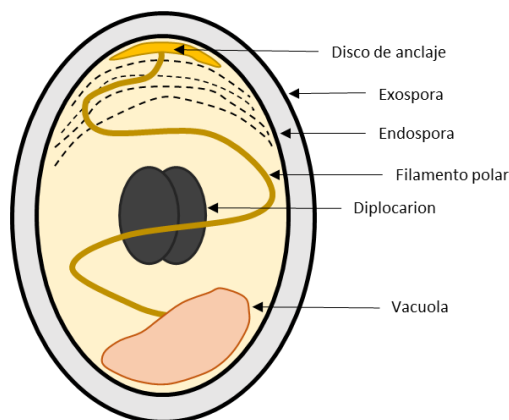
Aunque no se conoce en qué momento se produjo el primer contacto entre *N. ceranae* y *A. mellifera*, se piensa que la introducción en Asia de colonias de *A. mellifera*, debido a su mayor producción de miel, facilitó el contacto con las colonias de abejas autóctonas y, por tanto, con sus parásitos (*Varroa jacobsoni*, *Varroa destructor* y *N. ceranae*) produciéndose el salto a una nueva especie de abeja y adaptándose rápidamente a ella (Martín-Hernández *et al.* 2007; Huang *et al.* 2007). Adicionalmente, el comercio internacional de abejas por todo el mundo podría haber favorecido la diseminación rápida de estos patógenos, empezándose a identificar *N. ceranae* en muchas poblaciones de abejas en todo el mundo (Higes, Martín-Hernández y Meana 2006; Klee *et al.* 2007; Huang *et al.* 2008). Además, la mayor resistencia a la desecación y al calor

de *N. ceranae* con respecto a *N. apis* podría explicar su adaptación a climas templados y cálidos (Fenoy *et al.* 2009; Martín-Hernández *et al.* 2009).

Hoy en día, *N. ceranae* no sólo es más prevalente que *N. apis* en las colonias de abejas a pesar de haber sido descrita posteriormente, sino que en muchas regiones del planeta es la única especie encontrada (Fries 2010; Botías *et al.* 2012; Gisder *et al.* 2017; Martín-Hernández *et al.* 2018; Buendía *et al.* 2018).

#### 4.1.2. Estructuras celulares características

Las esporas son las formas de resistencia y de transmisión de estos organismos. Están formadas por una pared celular con dos membranas diferenciadas que les permite adquirir una gran resistencia condiciones climáticas adversas, la exospora y la endospora (Higes *et al.* 2007) (**Figura 3**). El interior de la espora está formado por el esporoplasma, en el cual se encuentra el disco de anclaje, el filamento polar y el diplocarion (núcleo doble), además de algunos ribosomas y una vacuola (Han y Weiss 2017). Carecen de algunos orgánulos celulares como las mitocondrias, el aparato de Golgi y peroxisomas, por lo que dependen en gran medida de la energía del hospedador para llevar a cabo su desarrollo y reproducirse rápidamente (Burri *et al.* 2006; Cornman *et al.* 2009).



**Figura 5.** Esquema de los componentes celulares de una espora de *N. ceranae*. Fuente: original.

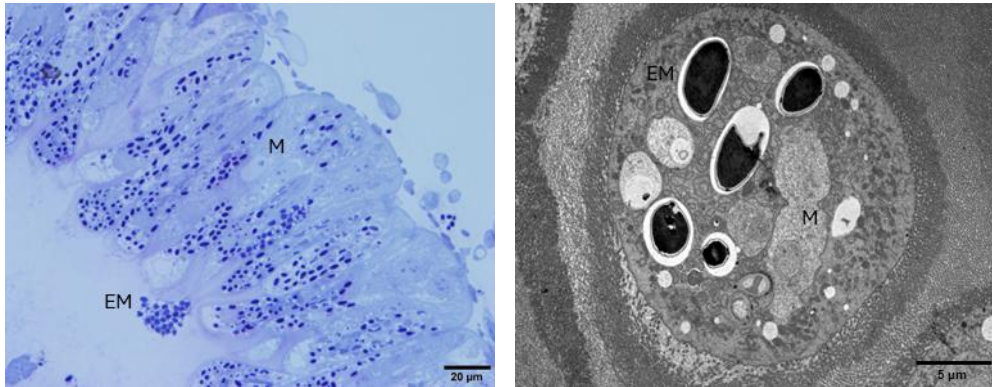
### 4.1.3. Ciclo biológico

La infección de *N. apis* y *N. ceranae* se produce en las células epiteliales del intestino medio, donde desarrollan su ciclo biológico (Higes *et al.* 2020a). Dicho ciclo consta de 3 fases: germinación, merogonia y esporogonia.

En la fase de germinación, las esporas llegan al intestino medio de la abeja y transfieren el material infectivo (esporoplasma) a la célula del hospedador mediante el filamento polar (Higes *et al.* 2007; Texier *et al.* 2010; Gisder *et al.* 2011).

Durante la fase de merogonia, el esporoplasma crece en tamaño y se desarrolla a meronte, con una nueva membrana, una región nuclear diferenciada y orgánulos muy poco desarrollados (Wittnet y Weiss 1999; Higes *et al.* 2007). Los merontes se multiplican de manera exponencial mediante reproducción asexual por fisión binaria, lo que resulta en un aumento del número de parásitos intracelulares (Higes *et al.* 2007).

En la fase de esporogonia, los merontes pasan a esporontes, que se caracterizan por el aumento del retículo endoplásmico y los ribosomas, además de que se inicia la producción de un material electrodenso con el que se formará la futura exospora (Higes *et al.*, 2007). Tras esto, los esporontes se vuelven a dividir por fisión binaria una vez más y se forman dos esporoblastos, a partir de los cuales se desarrolla la primera generación de esporas primarias binucleadas (Higes *et al.* 2007; Han y Weiss 2017; Han, Takvorian y Weiss 2020). Estas esporas primarias tienen una exospora no muy desarrollada y llevan a cabo la germinación intracelular infectando a las células adyacentes con su filamento polar (Higes *et al.* 2007; Gisder *et al.* 2011). Una vez en ellas, se obtiene una segunda generación de merontes que originarán esporas secundarias con una endospora más gruesa (Bigliardi y Sacchi 2001; Huang y Solter 2013). Por tanto, en una misma célula del ventrículo de la abeja podemos encontrar esporas primarias, secundarias y germinadas (Higes *et al.* 2007). Finalmente, la célula epitelial se encuentra llena de parásitos y se produce su lisis, liberándose las esporas secundarias a la luz del intestino (Higes *et al.* 2007; Huang y Solter 2013). Las esporas liberadas infectan de la misma manera nuevas células epiteliales del ventrículo y en cuestión de pocas semanas la infección se extiende por todo el epitelio, empezando desde la parte posterior y finalizando en la anterior (Fries 1988; Higes *et al.* 2007).



**Figura 6.** Imagen de microscopía óptica (MO) del epitelio del ventrículo infectado con esporas de *N. ceranae* a los 7 días tras la infección a la izquierda; e imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de células con esporas de *N. ceranae* en su interior a los 3 días tras la infección, a la derecha. M: Merontes; EM: Esporas maduras. Fuente: fotografías del CIAPA.

#### 4.1.4. Transmisión

Las esporas, al liberarse a la luz del tracto digestivo salen con las heces y así pueden infectar a otras obreras por vía fecal-oral mediante la ingesta de alimento o agua contaminadas o durante las labores de limpieza llevadas a cabo en el interior de las colonias (Smith 2012; Huang y Solter 2013). También se han encontrado esporas en el polen, la cera, la miel, la jalea real y en el semen de los zánganos (Cox-Foster *et al.* 2007; Higes *et al.* 2008a; Giersch *et al.* 2009; MacInnis, Keddie y Pernal 2020).

Aunque infecta principalmente a las abejas adultas, en estudios realizados tanto en condiciones de laboratorio (Eiri *et al.* 2015; BenVau y Nieh 2017) como en condiciones de campo (Urbieta-Magro *et al.* 2019a), se ha observado que las larvas y las pupas pueden infectarse con *N. ceranae*, aunque el nivel de infección en campo parece ser muy bajo (Urbieta-Magro *et al.* 2019a). Estas infecciones pueden tener diversas repercusiones patológicas en la etapa adulta posterior de las abejas, disminuyendo su esperanza de vida, acelerando el polietismo (determinadas funciones en función de la edad de la abeja) y, por lo tanto, alterando el equilibrio de la colonia.

Los zánganos juegan un papel importante en la transmisión ya que durante la primavera tienen libre circulación entre colmenas y son alimentados por las obreras (Smith 2012; Huang *et al.* 2012). Existe cierta controversia en cuanto a la susceptibilidad de la infección en los zánganos, dado que se ha

observado que son más susceptibles a la infección por *N. ceranae* que las abejas obreras (Retschnig *et al.* 2014) y se encuentran frecuentemente infectados en las colonias de abejas (Traver y Fell 2011; Martín-Hernández *et al.* 2012), pero también tienen una mayor capacidad para tolerar la infección (Huang *et al.* 2012). También se han encontrado esporas en el semen de los zánganos, por lo que el contacto sexual también podría ser una vía de transmisión horizontal del microsporidio (Traver y Fell 2011; Peng *et al.* 2015; Roberts *et al.* 2015).

La transmisión podría producirse también en las flores, que pueden contaminarse con las esporas tras la visita de abejas u otros polinizadores infectados con el patógeno (Graystock, Goulson y Hughes 2014; 2015; Müller, McMahan y Rolff 2019). También se han encontrado esporas viables de *N. ceranae* en las egagrópilas de abejarucos (Higes *et al.* 2008b; Valera, Martín-Hernández y Higes 2011; Valera *et al.* 2017). Estas aves se alimentan principalmente de abejas melíferas, por lo que las egagrópilas están compuestas por exoesqueletos de las abejas de las que se han alimentado. Dado que estas aves son migratorias y que las esporas de *N. ceranae* son altamente resistentes, pueden actuar como focos de diseminación del microsporidio entre diferentes zonas geográficas en las que nidifican o realizan sus vuelos migratorios.

Estas vías de diseminación de esporas, sumado al creciente comercio de abejas, así como del movimiento de colonias para trashumancia y de material apícola contaminado, han favorecido la rápida dispersión de *N. ceranae*, como sucede con otros patógenos, a nivel nacional e internacional.

#### **4.1.5. Efectos en la salud de las abejas**

Como ya se ha mencionado, el parásito infecta y se desarrolla en el interior de las células de epiteliales del ventrículo (Higes *et al.* 2020a) produciendo lesiones en el tejido que se van agravando a medida que la infección se extiende (Higes *et al.* 2007; Higes *et al.* 2008c; Higes, Martín-Hernández y Meana 2010) y, por consiguiente, pudiendo llegar a provocar su muerte, comprometiendo la funcionalidad de este órgano.

Dado que el ventrículo es el principal lugar de digestión del alimento y donde se produce la absorción de ciertos nutrientes, la lisis de las células epiteliales genera alteraciones en la función digestiva (Panek *et al.* 2018). Se ha

observado que las membranas peritróficas tienen un papel importante en la protección frente a la infección por *N. ceranae* al retrasar el periodo de infección y reducir el número de nuevas esporas producidas (de Oliveira *et al.* 2023). Por lo tanto, si las células epiteliales están destruidas (Higes *et al.* 2007; Higes *et al.* 2020a), no desarrollan adecuadamente la matriz peritrófica y no ejerce su función como barrera protectora contra los daños mecánicos producidos por los alimentos ni frente a otros microorganismos, lo que agrava la situación.

Se ha descrito que la infección afecta al metabolismo de la abeja mediante alteraciones de las rutas metabólicas de los carbohidratos (Holt, Aronstein y Grozinger 2013; Paris *et al.* 2017), ya que el microsporidio utiliza estos compuestos para completar su ciclo biológico (Aufauvre *et al.* 2014; Vidau *et al.* 2014). También se ha observado un aumento en la pérdida de proteínas y lípidos en la abeja (Li, Chen y Cook 2018; Li *et al.* 2019), lo que podría ser el origen de estrés energético que induce al aumento en el consumo de alimento por parte de la abeja desencadenando cambios fisiológicos (Alaux *et al.* 2011; Martín-Hernández *et al.* 2011; Vidau *et al.* 2014). Este estrés energético provoca alteraciones severas en órganos importantes como el cerebro y las glándulas hipofaríngeas (Aufauvre *et al.* 2014; Li *et al.* 2019). Al afectarse el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas (Wang y Moeller 1971; Alaux *et al.* 2011; Jack *et al.* 2016), también se ve comprometida la producción de jalea real, que influirá en la nutrición de los demás individuos de la colonia.

También se han observado alteraciones en el sistema inmunitario de la abeja relacionadas con una reducción de la transcripción de genes involucrados en la respuesta humoral (Antúnez *et al.* 2009; Chaimanee *et al.* 2014; Aufauvre *et al.* 2014), lo que puede disminuir su capacidad defensiva frente al microsporidio y otros patógenos. Además, se ha sugerido un mecanismo de los microsporidios para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador mediante la inhibición de la apoptosis de las células epiteliales infectadas (Higes *et al.* 2013a; Kurze *et al.* 2015; Martín-Hernández *et al.* 2017), lo que permite que el parásito se reproduzca antes de que se destruya la célula.

También produce alteraciones hormonales inhibiendo la producción de vitelogenina, una hormona que se encuentra en niveles altos en las abejas nodrizas y que regula la función de alimentación de las larvas (Dussaubat *et al.* 2013; Garrido *et al.* 2016); y estimula la producción de hormona juvenil,

característica de las pecoreadoras y que está relacionada con el comportamiento de la pecorea (Dussaubat *et al.* 2012; Ares *et al.* 2012; Goblirsch, Huang y Spivak 2013). Esto provoca una aceleración de la transición de abejas nodrizas a abejas pecoreadoras (Higes *et al.* 2008c; Lecocq *et al.* 2016; Fleites-Ayil, Quezada-Euán y Medina-Medina 2018). Este cambio de tarea repentino no sólo reduce la dedicación al cuidado a la cría, sino que también afecta a la eficiencia en las funciones de pecoreo. De hecho, el vuelo de las abejas infectadas es menos efectivo ya que recogen menor cantidad de néctar y polen (Dussaubat *et al.* 2013; Naug 2014) y que su tasa de retorno a la colmena es menor debido a la pérdida de la orientación, pérdida de memoria y de aprendizaje olfativo (Kralj y Fuchs 2010; Wolf *et al.* 2014; Gage *et al.* 2018). Todo esto se traduce en un menor almacenamiento de alimento y en una reducción de la población de abejas en la colmena, aumentando la probabilidad de la muerte de la colonia en los meses de invierno o, en caso de sobrevivir, llegando muy debilitada al inicio de la primavera (Higes *et al.* 2008c; Higes, Martín-Hernández y Meana 2010; Higes *et al.* 2013a; Botías *et al.* 2013).

Todas estas alteraciones que produce la infección por *N. ceranae* a nivel individual en las abejas tienen su repercusión a nivel de colonia. En el CIAPA de Marchamalo, durante un periodo de 2 años, se llevó a cabo la monitorización de un apiario para describir el desarrollo de la infección en colonias infectadas de forma natural permitiendo identificar 4 fases de la infección (Higes *et al.* 2008c). La primera fase es el inicio de la infección, que se da en los meses de primavera y es asintomática. Se caracteriza por haber un porcentaje de abejas infectadas por debajo del 60% y con un aumento de la infección en verano (Martín-Hernández *et al.* 2012). En la segunda fase, la reina continúa la puesta de huevos durante el invierno, que es un comportamiento inusual en la región donde se llevó a cabo el estudio, y también se observa una disminución en la producción de miel. La tercera fase tiene lugar al comienzo de la siguiente primavera, y en ella se observa un desarrollo rápido de la colonia debido a una puesta elevada de la reina, de tal manera que casi todos los cuadros de la colmena tienen cría. De esta manera, la colonia, aparentemente, parece estar fuerte pero realmente no se traduce en un aumento de la población ya que el nacimiento de nuevas abejas no compensa el número de abejas que mueren por la infección. Este comportamiento de la reina se alarga hasta el otoño. En la cuarta fase, se observa una disminución de la cría, debido

probablemente al agotamiento de la reina. Si esta fase tiene lugar en los meses fríos, la población de abejas es muy reducida y no pueden mantener la temperatura de la colonia. Debido a esto, después de un tiempo, la reina y las obreras mueren a causa del frío (Higes *et al.* 2010; Higes *et al.* 2013b; Botías *et al.* 2013). Sin embargo, si la colonia consigue sobrevivir al invierno, el porcentaje de abejas de interior y pecoreadoras infectadas es elevado por lo que llegan a la primavera muy debilitadas y, por lo general, la colonia no es capaz de prosperar (Higes *et al.* 2009).

Por todo ello, *N. ceranae* se considera un patógeno causante de importantes pérdidas de colonias en todo el mundo, especialmente debido a su elevada prevalencia en todo el planeta.

#### 4.1.6. *N. ceranae* y microbiota intestinal

Dadas las lesiones que produce *N. ceranae* en el intestino medio y la consiguiente alteración en la función digestiva, es muy probable que las comunidades bacterias del intestino posterior se vean afectadas.

Hasta el momento, se han desarrollado algunos trabajos en los que se han observado asociaciones positivas entre la microbiota intestinal y la infección por *N. ceranae*. En las abejas infectadas con el microsporidio, se encontró en una mayor abundancia de *G. apicola* (Rubanov *et al.* 2019; Castelli *et al.* 2020), *Bifidobacterium* spp. (Zhang *et al.* 2019; Castelli *et al.* 2020; Alberoni, Di Gioia y Baffoni 2023) y *S. alvi* (Panjad *et al.* 2021). Esta última también se asoció positivamente con la infección en *A. cerana* (Huang *et al.* 2018). Otros estudios muestran una disminución de la abundancia relativa de *A. kumkeei* y *Bifidobacterium* spp. en abejas infectadas por *N. ceranae* (Naree *et al.* 2022) y de *Lactobacillus* spp. (Rouzé *et al.* 2019; Alberoni, Di Gioia y Baffoni 2023). Por otro lado, se ha podido observar que el tratamiento de las abejas con antibióticos produce una modificación severa en la microbiota intestinal que parece favorecer la proliferación de *N. ceranae*, lo que hace indicar que las bacterias intestinales podrían tener un papel importante en la resistencia de la abeja a la infección y la replicación del microsporidio (Li *et al.* 2017).

Todos estos trabajos tienen en común el haber sido realizados con abejas infectadas de forma experimental en condiciones de laboratorio, controlando muchas de las variables a las que están expuestas en condiciones de campo. La gran variedad en las metodologías utilizadas en los diferentes

estudios hace complicada una comparación real con los resultados obtenidos en cada uno de ellos. Estas diferencias vienen dadas principalmente en la dosis de esporas suministradas para la infección, la edad a las que se las infecta, la duración del estudio, la edad de la abeja en el momento del análisis, la subespecie de abeja utilizada, si el análisis se realiza en abejas individuales o en un grupo de abejas, o la parte del intestino analizada (medio, posterior o entero).

Hasta el momento, son pocos los estudios en los que se haya analizado la posible modulación de la microbiota intestinal causada por la infección natural de *N. ceranae*, y los resultados son dispares. Hubert *et al.* (2017), analizando colectivamente abejas de colmenas positivas a *N. ceranae* y *N. apis*, mostró que la infección por los microsporidios no influyó en la composición de la microbiota intestinal. Otro trabajo señaló que únicamente hubo diferencias en la microbiota intestinal en abejas altamente infectadas con *N. ceranae*, revelando un aumento de la abundancia de bacterias pertenecientes al filo Pseudomonadota, pero sin variaciones en la diversidad bacteriana intestinal alfa ni en la beta (Jabal-Uriel *et al.* 2022a).

Por todo ello, actualmente hay cierta controversia sobre si la infección por *N. ceranae* tiene la capacidad de modular la microbiota intestinal de las abejas melíferas por sí misma o si están implicados otros factores, por lo que es un campo que aún requiere de más estudio.

## **4.2. Tripanosomátidos**

### **4.2.1. Principales especies en abejas melíferas**

Los tripanosomátidos son microorganismos eucariotas unicelulares pertenecientes a la familia Trypanosomatidae dentro del Reino Protista (Kaufer, Stark y Ellis 2020). Es un grupo de protozoos que está ampliamente distribuido geográficamente y que parasitan un amplio rango de hospedadores, desde plantas hasta insectos y vertebrados.

La primera especie de tripanosomátido en abejas melíferas se descubrió de Australia y se la denominó *Critbidia melliferae* (Langridge y McGhee 1967). Mediante cultivos celulares se aislaron tripanosomátidos del aparato digestivo de las abejas y determinaron su localización en el intestino posterior como formas libres o esferoides adheridas a las paredes intestinales del recto, e

incluso en las paredes del extremo posterior del íleon en los casos de infecciones más intensas. Unos años después, se descubrió *Crithidia bombi* (Lipa y Triggiani 1988) en el aparato digestivo de abejorros del sur de Italia. Desde este momento, los criterios de clasificación basados en el paradigma un parásito - un hospedador, hicieron que se aceptase que los tripanosomátidos que se encontraban en las abejas melíferas pertenecían a la especie *C. mellificae* y los que se encontraban en abejorros eran *C. bombi*.

Posteriormente, los avances en las técnicas de biología molecular permitieron el desarrollo de técnicas basadas en la detección de marcadores genéticos conservados de tripanosomátidos (Cox-Foster *et al.* 2007; Meeus *et al.* 2010) y con una secuenciación posterior, permitían la identificación a nivel de especie. Gracias a estas técnicas se pudo estudiar el genoma de estos organismos y se pudieron identificar diferencias genéticas que permitieron identificar otra especie nueva que infectaba abejorros, *Crithidia expoeki* (Schmid-Hempel y Tognazzo 2010). Un año después, se aisló una cepa a partir de abejas infectadas naturalmente de la cual se secuenció su genoma y, al aparecer en abejas, se asumió que se trataba de *C. mellificae* (Runckel *et al.* 2011).

Sin embargo, unos años más tarde, en un estudio realizado en nuestro país se compararon secuencias del gen *ARNr 18S* de tripanosomátidos de abejas muestreadas en diferentes regiones, y se observó que diferían de las secuencias de referencia de *C. mellificae* disponibles en aquel momento (Cepero *et al.* 2014). Debido al carácter conservado de este gen, estas diferencias sugerían la existencia de dos especies diferentes, lo que parecía confirmarse al analizar el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*). No obstante, no fue hasta el año siguiente en el que este nuevo taxón se caracterizó, por las diferencias tanto genéticas como morfológicas a la cepa de referencia de *C. mellificae*, como una nueva especie que se denominó *Lotmaria passim* (Schwarz *et al.* 2015).

La descripción de esta nueva especie en abejas melíferas supuso una revolución en la investigación de los tripanosomátidos en todo el mundo, ya que toda la información obtenida sobre prevalencia e impacto en las colonias debía ser analizada de nuevo con el fin de asignar la especie correcta en cada caso. Varios estudios, previos a la descripción de *L. passim*, habían obtenido secuencias genéticas de tripanosomátidos presentes en abejas y abejorros en

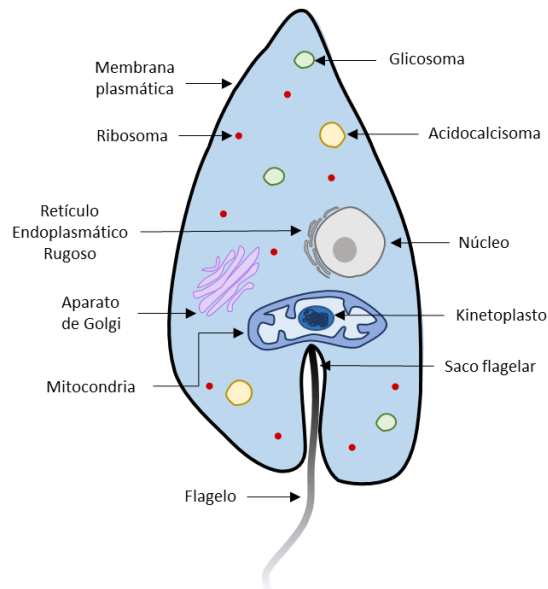
diferentes partes del mundo que se asignaron a *C. melliferae* (Meeus *et al.* 2010; Schmid-Hempel y Tognazzo 2010; Runckel *et al.* 2011; Ravoet *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013; Morimoto *et al.* 2013). Tras el nuevo análisis de las secuencias genéticas, se comprobó que en realidad se trataban de *L. passim*, haciendo evidente que la situación era muy diferente a la contemplada hasta ese momento.

A partir de ese punto, y debido a que eran dos las especies que podían infectar las abejas, se investigó en el desarrollo de métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) que permitieran la identificación específica a partir de una sola reacción (Arismendi *et al.* 2016; Stevanovic *et al.* 2016; Bartolomé *et al.* 2018). Estas nuevas técnicas mostraron elevadas prevalencias de tripanosomátidos en las colonias de abejas, por lo que se empezó a sugerir una posible asociación entre estos organismos y el aumento de la mortalidad de las colonias de abejas (Vejnovic *et al.* 2018; Xu *et al.* 2018; Williams, Tripodi y Szalanski 2019; Castelli *et al.* 2019; Hall *et al.* 2021; Bordin *et al.* 2022). El uso de cebadores específicos junto con las nuevas tecnologías de secuenciación reveló que en realidad era *L. passim* la especie predominante a nivel global y no *C. melliferae*, y que otras especies de tripanosomátidos comunes en otras especies de himenópteros como *C. bombi* y *C. expoekei* en abejorros o *Crithidia acanthocephalli*, capaz de proliferar en otros órdenes de insectos como dípteros, ortópteros o coleópteros (Hanson y McGhee 1963; Schmittner y McGhee 1970), también se encuentran presentes en las colonias de abejas melíferas (Bartolomé *et al.* 2020).

#### 4.2.2. Estructuras celulares características

Estos organismos poseen una morfología celular característica y distintiva de su grupo en la que destaca la presencia de una masa de círculos encadenados de ADN que representa aproximadamente el 30% del genoma de la célula denominado kinetoplasto (ADNk) (Fidalgo y Gille 2011), situado dentro de su única mitocondria (**Figura 5**). Esta última es la encargada de realizar la fosforilación oxidativa para la producción de energía (Stephens *et al.* 2007). También poseen un único flagelo en la parte anterior de la célula que juega un papel fundamental en las interacciones con el hospedador, ya que mediante cambios en su morfología permite evadir sus defensas o adherirse al epitelio intestinal del hospedador (Lopes 2010). Por otro lado, poseen otros orgánulos característicos como son los glicosomas, donde se realiza la

glucolisis (Parsons 2004); y los acidocalcisomas, donde se almacenan elementos inorgánicos como el calcio, el zinc, el magnesio o el potasio (Docampo *et al.* 2005).



**Figura 7.** Esquema de la estructura celular de *L. passim* y sus orgánulos. Fuente: original.

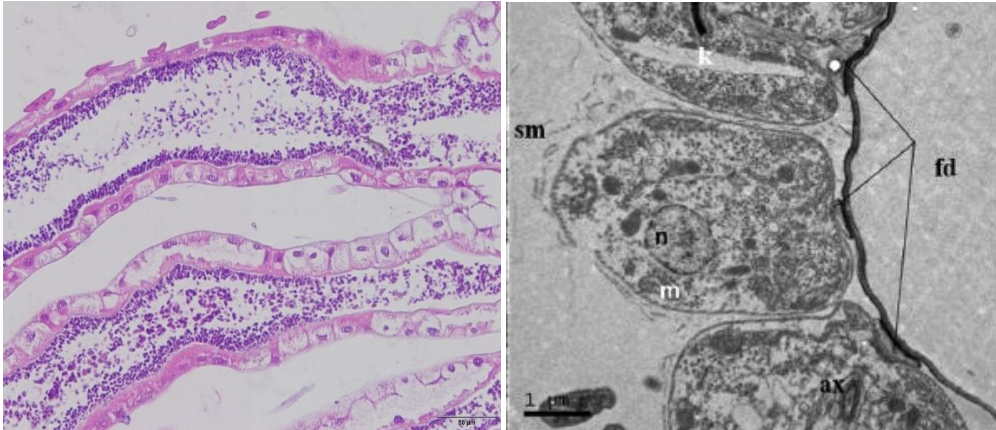
La superficie celular de estos organismos está compuesta por una membrana en la que se pueden distinguir tres zonas diferenciadas: membrana plasmática pelicular, membrana flagelar y membrana del saco flagelar. La membrana plasmática pelicular rodea la mayor parte de la célula y tiene el papel de protección y mantenimiento de la forma celular y del intercambio de sustancias (Landfear y Ignatushchenko 2001). La membrana flagelar envuelve el flagelo desde su origen y su importancia recae en la adhesión de la célula a la pared del tracto digestivo del hospedador (Kelly, Sanchez y Landfear 2020), además de actuar como receptor sensible a estímulos del medio y secretar sustancias mediante vesículas (Landfear y Ignatushchenko 2001; Maric, Epting y Engman 2010). En cuanto a la membrana del saco flagelar, forma un compartimento de donde emerge el flagelo y está compuesta por diferentes proteínas cuya función es la de adquirir nutrientes y participar en la evasión del sistema inmune del hospedador variando las proteínas de superficie y la morfología celular (Halliday *et al.* 2021).

### 4.2.3. Ciclo biológico

Los tripanosomátidos que parasitan las abejas melíferas son monoxenos, o con ciclo directo, que necesitan únicamente de un solo hospedador para completar su ciclo biológico que, generalmente, es un invertebrado (insectos) (Votýpka *et al.* 2015; Kaufner *et al.* 2017). Estos parásitos se encuentran de forma general en el intestino de la abeja, principalmente como formas libres en la luz intestinal o adheridas en la zona posterior del íleon y en el recto (Maslov *et al.* 2013; Lukeš *et al.* 2018; Buendía-Abad *et al.* 2022a).

En función de la especie y del momento del ciclo biológico, se pueden encontrar diferentes morfotipos que les han permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ampliando de esta manera su diversidad funcional. El estadio flagelado de *C. mellificae* presenta morfología de tipo coanomastigote, con extremo posterior redondeado. En cambio, el morfotipo flagelado predominante de *L. passim* es de tipo promastigote, con células lanceoladas y el extremo posterior puntiagudo (Schwarz *et al.* 2015; Gómez-Moracho *et al.* 2020; Buendía-Abad *et al.* 2021; Buendía-Abad *et al.* 2022a).

El ciclo biológico de estos microorganismos en el interior de las abejas aún no se conoce por completo. Se ha comprobado que al infectar abejas con formas flageladas de *C. mellificae* y *L. passim*, éstas cambian de morfología en el interior del hospedador. Así, se describió el morfotipo haptomonas, caracterizado por la remodelación flagelar que permite adhesión a las paredes del epitelio intestinal (Gómez-Moracho *et al.* 2020; Buendía-Abad *et al.* 2021; Buendía-Abad *et al.* 2022a).



**Figura 8.** Imagen de microscopía óptica (MO) del íleon con células de *C. mellifica* libres o adheridas al epitelio, a la izquierda; e imagen mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) del morfotipo haptomona de *L. passim* adherida a la superficie del recto, a la derecha. ax: axonema; fd: flagelopodio; k: kinetoplasto; m: mitocondria; n: núcleo; sm: microtúbulos subpelviculares. Fuente: extraída de Buendía-Abad *et al.* (2022a), con permiso de utilización.

Esto parece dilucidar que una parte importante del ciclo de vida de estos tripanosomátidos tiene lugar en el intestino posterior de la abeja. Sin embargo, aún se desconoce si parte de su ciclo biológico tiene lugar en el exterior del hospedador.

#### 4.2.4. Transmisión

Al igual que ocurre con las bacterias intestinales y otros parásitos como los microsporidios, el elevado número de individuos en un espacio muy reducido como es el interior de la colmena favorece la transmisión intracolonia. Dicha transmisión podría darse por vía fecal-oral en contacto con alimentos o superficies contaminadas; y oral-oral mediante las actividades que implican un contacto directo, como la trofalaxis o comportamientos de higiene. Teniendo en cuenta la localización de los tripanosomátidos en el intestino posterior, probablemente la vía más efectiva sea la fecal-oral (Strobl *et al.* 2019; Arismendi *et al.* 2020). En estudios recientes se ha detectado *L. passim* en estadios larvarios y pupales de abejas (Arismendi *et al.* 2022; Taric *et al.* 2020) y *C. bombi* en larvas de abejorros (Folly *et al.* 2017).

Sin embargo, hasta la fecha, se desconoce cómo sobreviven los tripanosomátidos fuera del hospedador, ya que no poseen formas de resistencia ni una pared celular que los proteja del exterior. El pillaje y la deriva parecen ser las vías de transmisión más probables entre colonias (Durrer y

Schmid-Hempel 1994). En los zánganos, se ha observado que la tasa de infección por *C. mellificae* y su carga parasitaria son superiores a las obreras, por lo que podrían actuar como transmisores eficaces del parásito (Buendía-Abad 2022). En cuanto a la transmisión entre distintas especies de polinizadores, la forma de transmisión más ampliamente aceptada es la del uso compartido de los recursos florales. Las abejas y los abejorros infectados podrían depositar formas infectivas de los parásitos en las plantas mediante las heces y contagiar a otros individuos durante la pecorea (Strobl *et al.* 2019; Arismendi *et al.* 2020; Figueroa, Grincavitch y McArt 2021). Por otro lado, algunos estudios han detectado ADN de *L. passim* en la superficie del ácaro *V. destructor* (Quintana *et al.* 2021), sugiriéndolo como posible vector mecánico del parásito.

#### 4.2.5. Efectos en la salud de las abejas

El impacto de los tripanosomátidos en la salud de las abejas melíferas aún no está del todo claro. Estos organismos se han considerado patógenos hasta hace pocos años cuando empezaron a detectarse a raíz del aumento de investigaciones por la pérdida de colonias a nivel mundial.

Hoy en día, no existe consenso sobre la acción patógena de los tripanosomátidos en las abejas. En la mayoría de los estudios se han realizado infecciones experimentales pero los resultados obtenidos no son uniformes e incluso, en ocasiones, contradictorios. Algunos observan un aumento poco significativo de la mortalidad de las abejas infectadas con formas esféricas de *C. mellificae* (Higes *et al.* 2016), mientras que en otros casos sí que aumenta significativamente la mortalidad cuando las abejas se infectan con morfotipos flagelados de *C. mellificae* o *L. passim* (Strobl *et al.* 2019; Gómez-Moracho *et al.* 2020). Otro trabajo en el que se realizaron infecciones experimentales con *L. passim* mostraron que, aunque la carga parasitaria aumenta significativamente en torno a los 7 días tras la infección, sólo causó un ligero aumento de la mortalidad de las abejas (Liu *et al.* 2020). Las infecciones experimentales en estos estudios se realizaron con distintas dosis y morfotipos, por lo que la disparidad de resultados podría deberse a estos factores. Asimismo, el mantenimiento prolongado de tripanosomátidos en cultivos celulares puede desembocar en una pérdida progresiva de la virulencia, pudiendo ser otra causa de que los resultados de estos trabajos sean tan divergentes (Moreira *et al.* 2012). De hecho, se ha probado que cepas de referencia de *L. passim* que

podrían llevar varios pases de cultivo, provocaron una menor mortalidad que cepas aisladas de campo (Buendía-Abad *et al.* 2021).

Este aumento de la mortalidad se ha relacionado con un aumento del estrés oxidativo de la abeja, lo que provoca alteraciones en proteínas y en estructuras fundamentales como las membranas celulares. Además, este estrés estimula el sistema inmune que, unido a la acción de otros parásitos o a un déficit nutricional, podría afectar a la supervivencia de las abejas (Taric *et al.* 2020).

También se ha sugerido que, al cubrir las paredes intestinales, puede comprometerse la absorción de nutrientes pudiendo incluso llegar a bloquear dicho proceso (Brooker 1971; Schaub 1994). Otra alternativa podría ser que las haptomonas absorban moléculas y metabolitos directamente desde el lumen o de las células epiteliales del intestino, lo que en ambos casos desembocaría en un déficit nutricional del hospedador. Adicionalmente, se ha propuesto la liberación de moléculas como metabolitos, proteínas o toxinas al lumen del intestino mediante vesículas, pero aún no se ha comprobado (Marcilla *et al.* 2014; Buendía-Abad *et al.* 2022a; 2022b).

Por el contrario, en abejorros existe mucha más evidencia de los efectos de la infección de *C. bombi*. Esta especie es capaz de afectar a todas las castas de la colonia de abejorros y, aunque en condiciones normales no parece causar una gran mortalidad, ésta aumenta notablemente en individuos estresados o con déficit nutricional (Brown, Loosli y Schmid-Hempel 2000). Además, *C. bombi* limita el desarrollo ovárico de las obreras de abejorros, restringiendo de esta manera su puesta y limitando el crecimiento de la colonia y, por tanto, favoreciendo la supremacía de la reina aumentando el altruismo y la cohesión social de la colonia infectada para asegurar su supervivencia hasta la siguiente primavera (Shykoff y Schmid-Hempel 1991; Schmid-Hempel 2001). Sin embargo, esto supone un riesgo para la colonia, ya que retardaría y limitaría la puesta de la reina especialmente tras la fundación de una nueva colonia lo que conlleva a una reducción del número de obreras, una menor recolección de recursos y, por tanto, una menor eficacia biológica de la colonia (Shykoff y Schmid-Hempel 1991; Schmid-Hempel 2001). Además, también parece afectar a la capacidad para transportar polen y néctar de las obreras que,

sumado a lo anterior, podría comprometer la viabilidad de la colonia durante la hibernación (Schmid-Hempel 2001).

#### 4.2.6. Tripanosomátidos y microbiota intestinal

Dado que los tripanosomátidos son parásitos intestinales que tienen como órgano diana las paredes intestinales del íleon y recto de las abejas melíferas, comparten nicho con las bacterias intestinales. Por ello, es muy posible que haya interacciones directas entre el parásito y la microbiota bacteriana.

Hoy en día son muy pocos los estudios que han analizado las posibles interacciones entre los tripanosomátidos y la microbiota intestinal de las abejas melíferas. En un par de estudios, la infección con *L. passim*, ya sea natural o experimental (Hubert *et al.* 2017; Liu *et al.* 2020), pareció no influir de manera importante en la microbiota intestinal. Sin embargo, se ha observado que las abejas son más susceptibles a la infección por *L. passim* cuando se interfirió en el establecimiento natural de la microbiota mediante estrés nutricional y social (Schwarz, Moran y Evans 2016).

En abejorros existe una mayor evidencia sobre los efectos que tienen los tripanosomátidos en su microbiota intestinal y prácticamente la totalidad de los trabajos han realizado infecciones experimentales en el laboratorio. En ellos, se ha visto que los abejorros a los que se les suplementa bacterias intestinales características presentaron niveles de infección por *C. bombi* mucho menores (Koch y Schmid-Hempel 2011; Blasco-Lavilla *et al.* 2023). Además, los individuos que poseen una elevada diversidad bacteriana de bacterias atípicas en el intestino son más susceptibles a la infección por *C. bombi* (Näpflin y Schmid-Hempel 2018).

En esta línea, otros estudios revelan que la presencia de *Gilliamella*, además de otras bacterias como *Apibacter* y *Lactobacillus* spp., disminuyen los niveles de *C. bombi* (Cariveau *et al.* 2014; Mockler *et al.* 2018). De hecho, un experimento llevado a cabo mediante cultivos de *Lactobacillus bombicola*, una bacteria común en el intestino de los abejorros, reveló que la acidificación del medio de cultivo causada por la bacteria inhibió el crecimiento de *C. bombi* (Palmer-Young, Raffel y McFrederick 2019). Esta reducción de pH se situaba dentro del rango encontrado previamente en abejas melíferas (Zheng *et al.* 2017), lo que sugiere que la presencia de *Lactobacillus* spp., junto a otras especies

como *G. apicola* capaces de producir ácidos mediante fermentación de azúcares que acidifiquen el interior del intestino, podría inhibir el crecimiento de *C. bombi*. Sin embargo, otros estudios revelaron que la infección aumentó la abundancia de *Lactobacillus* spp. y disminuyó en el caso de *Gilliamella* y *Snodgrassella*, sugiriendo una posible competencia por el espacio en el epitelio del íleon desplazando a estas bacterias y dejando más recursos nutricionales a las especies de *Lactobacillus* spp. favoreciendo su proliferación (Blasco-Lavilla *et al.* 2023).

Estos estudios sugieren que la infección no es la que modifica la microbiota intestinal, sino que es esta última la que controla y reduce la infección cuando las bacterias intestinales características de *Bombus* forman parte de la microbiota intestinal. Como se ha mencionado anteriormente, las especies bacterianas principales en el intestino de abejorros también lo son en las abejas melíferas por lo que es muy probable que estos beneficios que parecen otorgar en lo referido a la colonización por tripanosomátidos también se den en las abejas, aunque se requiere de futuras investigaciones para comprobarlo.

## 5. OTROS PARÁSITOS NO INTESTINALES

Las abejas melíferas también son parasitadas por una gran variedad de organismos, principalmente ácaros y virus que no se encuentran en el aparato digestivo y que afectan a su salud. De entre todos ellos, el parásito más importante y extendido es *V. destructor*.

### 5.1. *Varroa destructor*

*Varroa destructor* es un artrópodo de la clase Arachnida, incluido en el orden Mesostigmata, dentro de la familia Varroidae que únicamente contiene el género *Varroa*. Es un ectoparásito de las abejas que se considera una de las amenazas más graves y está implicado en la mortalidad de las colonias a nivel mundial.

En la década de 1950 y 1960, apicultores soviéticos y filipinos encontraron que un ácaro parasitaba sus colonias de abejas melíferas y por aquel entonces se consideraba que la especie que parasitaba a *A. mellifera* era *V. jacobsoni* (Oudemans 1904), descrita en las abejas asiáticas *A. cerana*

(Rinderer *et al.* 1999). En el año 2000, este ácaro se reclasificó como *V. destructor* (Anderson y Trueman 2000).

Se desconoce el momento en el que varroa pasó de *A. cerana* a *A. mellifera*, aunque se piensa que el comercio de colmenas europeas a Asia pudo ser la causante, aunque análisis genéticos también muestran que el salto de especie pudo haberse producido más de una vez (Oldroyd 1999). Es posible que la interacción y la adaptación de ambas especies de abejas en un mismo entorno pudo hacer que *V. jacobsoni* tuviera un periodo de especiación que dio lugar posteriormente a *V. destructor*. Una vez producido el salto de hospedador en Asia, se estima que esta nueva especie se extendió rápidamente por todo el continente llegando a Europa y América en la década de 1970 a través del comercio mundial de abejas melíferas, tanto legal como ilegal (Traynor *et al.* 2020). La descripción de *V. destructor* en el año 2000 en *A. mellifera* confirmó que el ácaro encontrado en las abejas europeas no se trataba de *V. jacobsoni* sino de *V. destructor*.

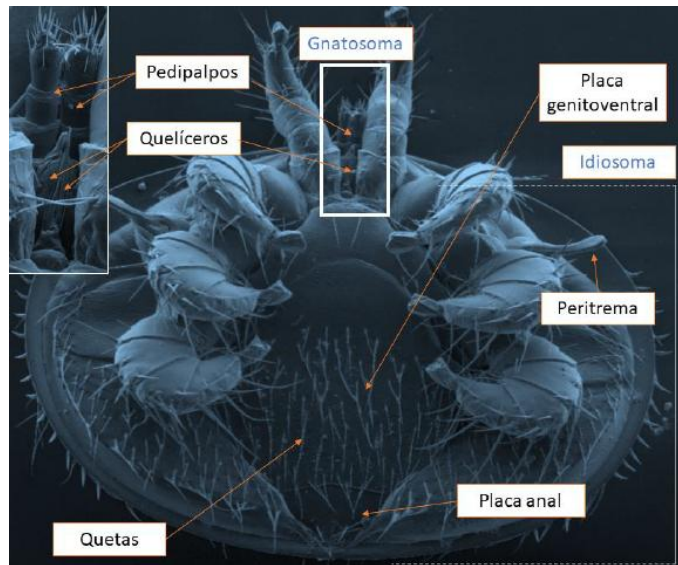
Este ácaro supone una seria amenaza para la apicultura mundial, existiendo actualmente pocas localizaciones en el mundo libres del ácaro, quedando reducidas a zonas geográficamente aisladas como las islas, como es el caso de la isla de Pascua (Gobierno de Chile 2024), las islas Åland o algunas de las islas de Azores (Comisión Europea 2021), entre otras.

### 5.1.1. Características morfológicas

El estructura de *V. destructor* está dividido en dos zonas, la parte anterior o gnatosoma y la parte posterior o idiosoma. En el gnatosoma está formado por las piezas bucales, formadas por pedipalpos y los quelíceros. Estos últimos, que solo poseen las hembras, son utilizados para romper la cutícula de las abejas para poder alimentarse del cuerpo graso y la hemolinfa de estas (Ramsey *et al.* 2019). Al igual que todos los arácnidos, *V. destructor* tiene cuatro pares de patas. El primer par, se utilizan para la locomoción, mecanorrecepción y quimiorrecepción (Rosenkranz, Aumeier y Ziegelmann 2010). El extremo de cada una posee una estructura llamada apotele, que actúa como una ventosa para fijarse a la superficie de la abeja.

Este ácaro posee un dimorfismo sexual claro. Al alcanzar la fase adulta, las hembras, diploides, poseen un idiosoma elipsoidal aplanado y adquieren un color rojizo. En el caso de los machos, haploides, tiene un tamaño menor y su

melanización es muy débil, mostrando un color blanquecino. Además, sus patas son más largas que las de las hembras y sus palpos se han modificado como una estructura especializada que permite depositar el saco espermático en el tracto genital de las hembras (Rosenkranz, Aumeier y Ziegelmann 2010). Otra diferencia con las hembras es que los machos desarrollan su ciclo biológico únicamente en las celdillas de cría operculadas.



**Figura 9.** Estructuras principales de la hembra adulta de *V. destructor*. Fuente: extraída de Benito-Murcia (2023), con permiso de utilización.

### 5.1.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *V. destructor* se divide en dos fases: una fase reproductiva y una fase de dispersión.

Las hembras en fase de dispersión se transportan en las abejas adultas y se introducen en las celdillas de cría para reproducirse (Kuenen y Calderone 2000). Una vez en el interior de la celdilla, permanecen ocultas en el fondo entre el alimento larvario para no ser detectadas por las abejas adultas hasta que éstas operculan la celdilla. El ácaro, además, segrega unas kairomonas que son muy parecidas a las que producen las abejas para pasar desapercibidas (Kather *et al.* 2015). Las hembras de varroa tienen una mayor preferencia por las celdillas de zánganos, posiblemente debido a que, al encontrarse en zonas periféricas del área de cría, la temperatura es ligeramente menor y más adaptada a las necesidades del ácaro (Calderone y Kuenen 2003; Ifantidis

1983). Además, las celdillas de zánganos tienen un mayor tamaño y el tiempo de desarrollo de éstos es mayor por lo que la cantidad de ácaros que se forman en las celdillas de zánganos es muy superior a la producida en las celdillas de las obreras (Donzé y Guerin 1994).

*V. destructor* posee una determinación de sexos basada en la partenogénesis arrenotócica (Häußermann, Ziegelmann y Rosenkranz 2016; Häußermann *et al.* 2019). De esta manera, el primer huevo, que pone aproximadamente a las 60 horas desde la operculación de la celdilla, no está fecundado y genera un macho. Los huevos posteriores que pone la varroa, uno cada 30 horas, están fecundados y, por tanto, generarán hembras.

Cuando los huevos eclosionan, la larva pasa por tres fases diferentes hasta completar su desarrollo: protoninfa, deutoninfa y adulto. El macho alcanza la fase adulta en algo más de 6 días, de manera que cuando las hembras alcanzan la madurez sexual, el macho ya es maduro y se produce el apareamiento (Martin 1994; Ziegelmann *et al.* 2013). De esta forma, cuando la abeja adulta ya formada emerge, hay algunas hembras de varroa que están fecundadas mientras que otras no, pasando a la fase de dispersión. Estas varroas vírgenes, al comenzar de nuevo el ciclo, ponen el primer huevo partenogénico del que nace el macho y, una vez maduro, se aparea con él, de tal modo que la hembra se fecunda y ya puede poner huevos fecundados que darán lugar a nuevas hembras (Häußermann *et al.* 2019).



**Figura 10.** Zángano, a la izquierda; y obrera, a la derecha, siendo parasitados con *V. destructor*. Fuente: imagen derecha, fotografía del CIAPA; imagen izquierda, tomada por Mariano Higes.

### 5.1.3. Efectos en la salud de las abejas

El primer daño que el ácaro produce en la abeja es la lesión en la cutícula para alimentarse del cuerpo graso y de la hemolinfa (Ramsey *et al.* 2019; Han *et al.* 2024), por la que pueden penetrar bacterias (Kanbar y Engels 2003). Esta acción produce un debilitamiento de la abeja, ya que el cuerpo graso está involucrado, entre otras funciones, en el almacenamiento y movilización de energía, en la síntesis de proteínas y grasas, en el crecimiento de la abeja, en la respuesta inmune y en la detoxificación de pesticidas (Arrese y Soulages 2010). De igual manera, la hemolinfa es el fluido que circula por el interior del insecto y cuya función es el transporte de agua y otros componentes entre los que se incluyen los hemocitos, nutrientes, hormonas y metabolitos (Bowen-Walker y Gunn 2001; Annoscia, Del Piccolo y Nazzi 2012; Annoscia *et al.* 2019).

Dado que las hembras adultas son las únicas que tienen quelíceros que permiten atravesar la cutícula de la abeja, las hembras inmaduras y los machos lo hacen a través de las membranas de articulación de las larvas, ocasionándolas un grave daño (Donzé y Guerin 1994; Han *et al.* 2024). De hecho, esta absorción en la larva puede provocar una disminución de hasta un 25% de su peso (Bowen-Walker y Gunn 2001; Garedew, Schmolz y

Lamprecht 2004). Esta pérdida de peso se traduce en una peor capacidad de vuelo, un menor tamaño corporal y una producción menor de esperma en el caso de los zánganos, perdiendo de esta manera eficacia reproductiva (Duay, De Jong y Engels 2002). Como la parasitación también influye reduciendo la expresión de genes relacionados con la inmunidad, también acorta la vida del hospedador (Aronstein *et al.* 2012; Dainat *et al.* 2012).

Además, las abejas ven acelerada sus funciones en la colonia ya que la parasitación hace que las abejas nodrizas inicien la pecorea antes de tiempo, por lo que la capacidad de aprendizaje, orientación y búsqueda de alimento se ve alterada (Kralj y Fuchs 2006).

Por otro lado, quizás uno de los principales factores que hacen de *V. destructor* un patógeno importante, es su papel como vector de un gran número de virus que afectan a las abejas. Al alimentarse de los tejidos de las abejas, el ácaro puede ingerir los patógenos que residen en ellas o transmitírseles si ya los posee. Entre ellos se encuentran el virus de las alas deformadas (*Deformed wing virus*, DWV), uno de los virus más prevalentes y patógenos en las abejas melíferas (Wilfert *et al.* 2016). Aunque este virus tiene diferentes vías de transmisión, *V. destructor* ha contribuido enormemente en su distribución y aumentando su patogenicidad (Mazzei *et al.* 2014; Wilfert *et al.* 2016).

Entre otros virus de los que varroa puede ser vector se encuentran los virus del complejo de las parálisis, que se componen del virus de la parálisis aguda (*Acute bee paralysis virus*, ABPV), el virus Kashmir (*Kashmir bee virus*, KBV) y la variante israelí de la parálisis aguda (*Israeli acute paralysis virus*, IAPV) también parecen ser transmitidos por *V. destructor* (de Miranda, Cordoni y Budge 2010; Martin *et al.* 2012; Mondet *et al.* 2014).

A nivel de colonia, el daño que ocasiona *V. destructor* no sólo depende del número de ácaros en la colmena, sino que depende de muchos factores como la estación del año, el número de cría afectada o la presencia de virus. Sin embargo, lo que está demostrado es que una elevada tasa de infestación produce comportamientos anómalos en el cuidado de la cría y la pecorea que pueden llevar a la muerte de la colonia (Le Conte, Ellis y Ritter 2010).

#### 5.1.4. *V. destructor* y microbiota intestinal

El ácaro *V. destructor* se sitúa en la superficie de las abejas, por lo que a priori podría suponerse que las barreras físicas de la propia abeja hacen que sea complicado que haya interacción directa con las bacterias intestinales. Sin embargo, los graves efectos de la parasitación, junto con la transmisión de virus, podrían hacer que el estrés fisiológico e inmunológico que genera en la abeja tenga repercusión en la homeóstasis intestinal. Por tanto, la parasitación por *V. destructor*, aunque sea de forma indirecta, puede tener cierta influencia en la microbiota intestinal de la abeja.

A pesar de ello, no existen muchos estudios que investiguen esta relación. Algunos de ellos han identificado en colonias de abejas con *V. destructor* la bacteria *Arsenophonus* spp., que también aparece ocasionalmente en las abejas, en el ciego de *V. destructor* (Hubert *et al.* 2015; 2016). La presencia de esta bacteria se ha asociado con una mala salud de las abejas, ya que su abundancia aumenta en colonias afectadas por el colapso de las colonias (*Colony Collapse Disorder*, CCD) (Budge *et al.* 2016; Cornman *et al.* 2012). Además, también ha detectado la bacteria intestinal *Ba. apis* en *V. destructor*, sugiriendo que podría actuar como reservorio de esta bacteria (Hubert *et al.* 2015).

Por otro lado, algunos estudios muestran que *V. destructor* no influye en la microbiota intestinal (Kim, Kim y Park 2023), mientras que otros observan que la abundancia de algunos taxones troncales se ven modificados en el intestino de la abeja (Hubert *et al.* 2017; Marche *et al.* 2019).

Dado que los estudios de microbiota realizados hasta el momento se han llevado a cabo en regiones donde ya estaba establecido el ácaro, no se sabe con certeza si la aparición de *V. destructor* modificó la microbiota original de las abejas, por lo que investigar las abejas de zonas libres de este parásito permitiría comprender mejor las repercusiones que ha tenido en las poblaciones de abejas afectadas. Asimismo, permitiría evaluar de una forma más precisa la influencia de este patógeno en la microbiota intestinal de las abejas.

## 6. PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS

La aplicación de tratamientos para el control de los parásitos que afectan a las abejas es de especial importancia en la apicultura moderna. Estos tratamientos buscan mitigar el impacto de los principales patógenos y parásitos sobre la salud de las colonias, asegurando su supervivencia y productividad.

Actualmente, no hay ningún medicamento veterinario registrado para el control de la nosemosis en Europa, aunque durante décadas se utilizó la fumagilina, un antibiótico para tratamiento de la nosemosis en las abejas en Norteamérica (Huang *et al.* 2013). La Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) autorizó su uso y parecía ser eficaz contra *N. apis* y *N. ceranae* (Higes *et al.* 2008c; Higes *et al.* 2011; Nozal *et al.* 2008; Botías *et al.* 2013). Sin embargo, en la actualidad, ya no está permitido en Europa debido a que no está definido el límite máximo de residuos (LMR) en la miel, aunque todavía se aplica en otras partes del mundo (Formato *et al.* 2022). Además, se ha visto que puede afectar negativamente a la salud de las abejas (Van Den Heever *et al.* 2014) y, como ya se ha mencionado anteriormente, el uso de antibióticos puede alterar la microbiota intestinal de la abeja, facilitando de esta manera la infección por otros patógenos oportunistas y fomentar la aparición de resistencias a los mismos (Tian *et al.* 2012; Raymann, Shaffer y Moran 2017; Li *et al.* 2017).

En cuanto a *V. destructor*, la Unión Europea dictamina, según el Reglamento (UE) 2016/429, que en los estados miembros debe existir un programa de erradicación del ácaro o en caso de estar libres de la enfermedad, deben aportar pruebas de ello. Actualmente existen unos 20 productos comerciales aprobados por la AEMPS para el tratamiento de este parásito. Sin embargo, el uso inadecuado de ellos, muchas veces sin el debido control veterinario, y su acumulación en las diferentes matrices de la colmena (Calatayud-Vernich *et al.* 2018; Alonso-Prados *et al.* 2020; El Agrebi *et al.* 2020; Benito-Murcia *et al.* 2021) han generado ácaros resistentes a muchos de estos productos (González-Cabrera *et al.* 2013; Higes *et al.* 2020b; Benito-Murcia *et al.* 2022). Además, se ha observado que la exposición a dosis subletales a algunos de estos acaricidas, como el tau-fluvalinato y el cumafós, producen cambios en el comportamiento de las abejas y alteran algunos biomarcadores implicados en la neurotoxicidad, biotransformación y estrés oxidativo (Benito-Murcia *et al.* 2022, 2023).

Por ello, es necesario generar estrategias alternativas para la prevención o el tratamiento de estos patógenos que no dejen residuos en la colmena y que contribuyan a mejorar la salud de las abejas melíferas. Es aquí donde aparece la figura de los prebióticos y probióticos.

Los prebióticos son alimentos o extractos de ellos que aportan nutrientes no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad metabólica de las bacterias intestinales (Gibson y Roberfroid 1995). Se ha observado que la incorporación de ciertos fitoquímicos, como extractos orgánicos y suplementos naturales, en la alimentación de las abejas promueven el crecimiento de microorganismos intestinales beneficiosos (Geldert *et al.* 2021), además de aumentar la longevidad de las abejas y la resistencia a patógenos (Bernklau *et al.* 2019). Se han utilizado algunos productos de este estilo que parecen disminuir el número de esporas de *N. ceranae* y aumentar la supervivencia de las abejas infectadas, pero no se ha evaluado su impacto en las comunidades bacterianas intestinales. Algunos de estos compuestos son el quitosano, que es una forma desacetilada de la quitina (Saltykova *et al.* 2018; Valizadeh, Guzman-Novoa y Goodwin 2020); la narangenina, una flavona de los cítricos (Borges, Guzman-Novoa y Goodwin 2020); o harinas de semillas de *Brassica nigra* (Nanetti *et al.* 2021). También se han probado compuestos comerciales como el ApiHerb®, suplemento dietético a base de plantas (ajo y canela) y vitaminas (Michalczyk, Sokół y Koziątek 2016; Cilia *et al.* 2020); HiveAlive™, suplemento a base de algas marinas (Charistos, Parashos y Hatjina 2015); o Nozevit®, suplemento fitofarmacológico (Higes *et al.* 2014) que mostraron un efecto significativo contra las infecciones por *N. ceranae*. Sin embargo, algunos de ellos no han mostrado resultados positivos, como por ejemplo la administración de inulina que aumentó el número de esporas de *N. ceranae* y afectó significativamente a la supervivencia de las abejas (Ptaszyńska *et al.* 2016) o de la goma de acacia, que aumentó la mortalidad de las abejas infectadas por *N. ceranae* (Borges, Guzman-Novoa y Goodwin 2020).

Los probióticos son complementos alimenticios que poseen microorganismos vivos que, administrados en las dosis adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador mejorando el equilibrio de microorganismos intestinales (Fuller 1989). Existen pruebas de que los probióticos pueden ayudar a controlar los parásitos de las abejas melíferas. La alimentación de las colonias de abejas melíferas con *Bacillus subtilis* redujo el

recuento de esporas de *Nosema* spp. a lo largo de un estudio de ocho meses, aunque la reducción del recuento de esporas sólo fue significativa durante dos de esos meses (Sabaté *et al.* 2012). La alimentación de abejas enjauladas con *A. kunkzei* redujo la carga de esporas de *N. ceranae* en comparación con las abejas control no tratadas (Arredondo *et al.* 2018), al igual que la alimentación de abejas en colmenas con otra bacteria intestinal, *P. apium* (ahora *Bo. apis*) (Corby-Harris *et al.* 2016). Además, los probióticos comerciales Bactocell®, Levucell SB® (El Khoury *et al.* 2018) y Protexin® Concentrate (Borges, Guzman-Novoa y Goodwin 2021) aumentaron la supervivencia de las abejas infectadas por encima de la de las abejas no infectadas. En cambio, alimentar a abejas infectadas en jaulas con una mezcla de varias especies de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*), *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodopseudomonas palustris* provocó un aumento significativo del recuento de esporas de *Nosema* en comparación con las abejas de control infectadas (Andrearczyk y Knaga 2014).

En cuanto a la administración de probióticos para el control y tratamiento para la infección por tripanosomátidos hay muy pocos datos y la mayoría de ellos se han obtenido en abejorros del género *Bombus* infectados con *C. bombi* (Mockler *et al.* 2018). En abejas, se ha observado que la administración de *S. alvi* previa a la infección por *L. passim* aumenta la susceptibilidad a la parasitación por el tripanosomátido (Schwarz, Moran y Evans 2016; Schmidt y Engel 2016). Además, produce una perturbación general de la microbiota intestinal con un aumento de las especies que componen la microbiota y que podría disminuir la resistencia a la infección, como pasa en los abejorros (Näpflin y Schmid-Hempel 2018).

En el caso de *V. destructor* también se ha investigado el posible uso de bacterias como método de control biológico de los ácaros. Algunas especies bacterianas aisladas de abejas sanas y de ácaros muertos, como *B. asteroides*, *A. kunkzei* y *Bacillus thuringiensis*, mostraron efectos acaricidas causando una mortalidad del 95-100% de las varroas a los tres días (Saccà y Lodesani 2020). Este estudio se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, por lo que sería necesario investigar si estos efectos se mantienen en el ambiente natural de la colmena y asegurar que el tratamiento no afecta a la salud de las abejas. Otra línea de investigación muy novedosa ha realizado la modificación genética de la bacteria intestinal *S. alvi* para inducir respuestas inmunitarias mediante ARN

de interferencia (ARNi) (Leonard *et al.* 2020). Esta bacteria una vez establecida en la abeja, activa la respuesta inmune mediante ARNi reduciendo la supervivencia de *V. destructor* y la replicación del virus DWV, aumentando la supervivencia de las abejas parasitadas. A pesar de ser una esta estrategia con gran potencial para controlar estos patógenos, se requieren muchos estudios adicionales antes de su aplicación en campo, debido a los riesgos que conlleva la transferencia horizontal de genes y los posibles efectos ecológicos y evolutivos que puede generar.

Así pues, no se puede dar por sentado que todos los probióticos aporten beneficios a las abejas melíferas y, por ello, han de estudiarse profundamente antes de que su utilización para el control de los parásitos llegue a extenderse de forma generalizada.



# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





A pesar de los grandes avances logrados en la última década en el estudio de la microbiota intestinal de las abejas melíferas, y de la clara evidencia de su papel fundamental en la salud de estos insectos, aún existen muchos aspectos por investigar para comprender en profundidad las complejas interacciones entre la microbiota y su hospedador. Asimismo, las interacciones entre la microbiota y los patógenos que afectan a las abejas sigue siendo un campo lleno de interrogantes, lo que resalta la necesidad de seguir investigando en este área.

Desde hace más de 25 años, el Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA) ha desarrollado diversas líneas de investigación sobre los principales parásitos que afectan a las abejas melíferas. Sin embargo, aún existen muchas cuestiones que quedan por aclarar. Por ejemplo, se desconoce cómo estos patógenos interactúan con la microbiota intestinal de las abejas, o si su presencia puede modificar dicha microbiota o de qué manera esta alteración puede contribuir a la patogenicidad de los parásitos. Además, también falta por esclarecer algunos de los factores que pueden influir en el establecimiento de una microbiota intestinal equilibrada y funcional.

En este contexto, la presente tesis doctoral busca profundizar en la comprensión de dichas interacciones y su posible influencia en las comunidades bacterianas intestinales. Este trabajo da continuidad a la línea de investigación previamente abierta en la que se observó como la infección natural del microsporidio influía de cierta manera en la microbiota intestinal, ampliando ahora el estudio de manera más exhaustiva y detallada. Además, la colaboración con otros grupos de investigación ha sido clave para abordar de forma correcta los ensayos llevados a cabo, como son el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) o el grupo de investigación en Medicina Genómica de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

Sin embargo, a pesar de que algunos estudios ya han reportado resultados, aunque muy dispares, sobre la influencia de los microsporidios, los tripanosomátidos o el ácaro *Varroa destructor* en la microbiota intestinal, todos ellos han analizado abejas que muy probablemente ya han estado expuestas a estos parásitos o proceden de linajes de abejas en los cuales estas interacciones

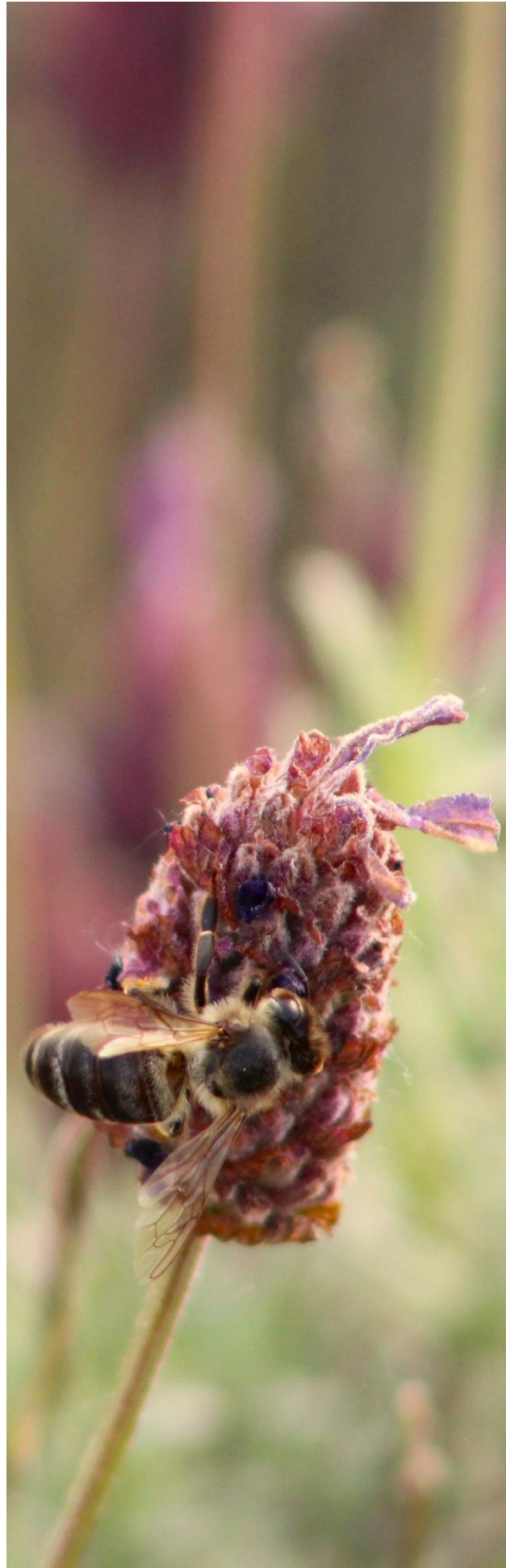
pudieron haber alterado previamente su microbiota. Por lo tanto, es fundamental investigar la microbiota intestinal en abejas procedentes de áreas no expuestas a estos parásitos para obtener una mejor comprensión sobre su impacto y conocer la exposición de las abejas a otros parásitos intestinales que puedan interferir en los mismos.

Teniendo en cuenta lo expuesto, la presente Tesis Doctoral propone un estudio mediante el empleo de diversas técnicas moleculares que aborda todos estos aspectos, con el **objetivo general** de esclarecer la influencia de los parásitos más distribuidos a nivel mundial en la microbiota intestinal de las abejas. Para cumplir con el objetivo propuesto, se fijaron los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Determinar la prevalencia de tripanosomátidos en colonias de abejas geográficamente aisladas que se han mantenido libres de patógenos importantes como *V. destructor* y/o *N. ceranae*.
- II. Determinar que modificaciones se producen en la microbiota intestinal de abejas parasitadas por *V. destructor*, *N. ceranae* y *L. passim* de estas áreas en comparación con las libres de estos parásitos.
- III. Describir factores dependientes del hospedador y de los patógenos que pueden influir en la microbiota intestinal.

Para alcanzar estos objetivos, se utilizaron muestras de estudios previos, lo que hizo necesario llevar a cabo un análisis metodológico previo para determinar si los protocolos de extracción de ADN que fueron utilizados para dichas muestras permitían el estudio de la microbiota intestinal de las abejas y de sus parásitos.

# **METODOLOGÍA GENERAL**





## 1. METODOLOGÍA GENERAL

Para cumplir con los objetivos propuestos para esta tesis, se han utilizado diversas metodologías, que abarcan desde la recogida de muestras en las colonias de abejas hasta su procesado para extraer el material genético y el análisis molecular.

Dado que una parte de la metodología ha sido común en los distintos capítulos, en esta sección se explican de forma conjunta los procedimientos utilizados. Las modificaciones y/o adaptaciones realizadas se describen en cada uno de los capítulos.

## 2. DECLARACIÓN ÉTICA

La protección de los animales empleados con fines científicos en la Unión Europea se encuentra regulada por la Directiva 2010/63/UE, la cual establece un marco ético para el cuidado y mantenimiento de estos animales durante la experimentación científica. Esta normativa aplica principalmente a animales vertebrados, mientras que dentro de los invertebrados solo se consideran a los cefalópodos. Por lo tanto, no se requirieron permisos específicos para las investigaciones realizadas en la presente Tesis Doctoral. Sin embargo, en todo momento se siguieron las normas de bienestar animal para minimizar, en la medida de lo posible, el sufrimiento de las abejas.

## 3. RECOGIDA DE MUESTRAS

Las abejas recogidas en las colmenas se destinaron principalmente a:

- Determinación de los protocolos de extracción de material genético más apropiados para la detección y cuantificación de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos (**Capítulo I**).
- Caracterización de las bacterias intestinales de abejas que no han estado expuestas a *V. destructor* ni *N. ceranae* (**Capítulo III**).

### 3.1. Manejo de abejas en el campo

Para aquellos experimentos en los que se necesitaban abejas adultas, estas se obtuvieron según la metodología descrita previamente (Meana, Martín-Hernández y Higes 2010). Las muestras de abejas obreras del interior de las colmenas se tomaron de uno o varios cuadros externos de cada colmena, evitando recoger abejas nodrizas muy jóvenes y la reina. Las abejas se barrieron con cuidado con un cepillo de apicultor y se introdujeron en cajas de cartón debidamente rotuladas con su número de colmena para su transporte al laboratorio.

Durante el muestreo se prestó especial atención a la cámara de cría y a las abejas, así como a la piquera y los alrededores de la colmena en busca de signos clínicos o alteraciones en las colonias que indicaran la presencia de cualquier patógeno.



**Figura 11.** Manejo de abejas adultas en las colmenas. Colmenar Experimental del CIAPA de Marchamalo, a la izquierda; y recogida de abejas obreras adultas, a la derecha. Fuente: original.

Las muestras se registraron a la llegada al laboratorio y, posteriormente, las abejas se sacrificaron introduciéndolas en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Procesado de las muestras y extracción de ADN

Debido a que gran parte de las muestras de abejas utilizadas en cada uno de los capítulos procedían de estudios previos, el procesado y la extracción del material genético de las muestras de cada capítulo fue diferente. Además, la extracción del ADN en alguno de ellos se realizó de forma colectiva mientras

que, en otros, de forma individual, como se explica en los capítulos correspondientes.

Sin embargo, algunos aspectos fueron comunes durante el procesado de las muestras y se explican a continuación.

En el caso del procesado de abejas de manera colectiva, se siguió la metodología descrita por (Martín-Hernández *et al.* 2012). Las abejas se introdujeron en bolsas estériles con filtro con agua calidad PCR o tampón AL (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) para su macerado en un *Stomacher 80 Biomaster* (Seward Ltd., Worthing, Reino Unido) durante 1 minuto a velocidad alta. El número de abejas y el volumen de agua Milli-Q fue variable y se encuentra especificado en cada capítulo. El filtrado de cada muestra se pasaba a un tubo Falcon de 15 mL estéril. De este, se tomó una alícuota (volumen definido en cada capítulo) y se transfirió a una placa de 96 pocillos en la que cada pocillo contenía 5 perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos).



**Figura 12.** Procesado de muestras. *Stomacher 80 Biomaster* y bolsas estériles con filtro, a la izquierda; líquido obtenido del macerado conjunto de las abejas, a la derecha. Fuente: original.

Para el procesado de abejas individuales, se siguieron los protocolos descritos previamente (Jabal-Uriel *et al.* 2022a). Se utilizaron pinzas estériles para separar cuidadosamente el abdomen o el intestino del resto del cuerpo. Cada muestra se depositó en un pocillo de una placa de 96 que contenían 5

perlas de vidrio de 2 mm de diámetro (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) con 180  $\mu$ L de agua calidad PCR.

Una vez se dispuso de las muestras en la placa con las perlas de vidrio, se homogenizaron en un *TissueLyser* (Qiagen®, Hilden, Alemania) durante 90 segundos a 30 Hz. A continuación, se extrajo una alícuota para realizar la extracción del material genético. El volumen de esta alícuota dependió del protocolo de extracción que se seguiría posteriormente. Los protocolos de extracción quedan explicados con detalle en el **Capítulo I**.

### 3.3. Análisis moleculares

Una vez realizada la extracción del ADN, se realizaron los análisis moleculares para la detección y/o cuantificación de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos.

#### 3.3.1. PCR convencional.

Las reacciones de PCR convencional se realizaron en placas de 96 pocillos en un termociclador *MasterCycler® ep gradient S* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) (**Figura 13**) en un volumen final de 25  $\mu$ L en cada reacción

##### 3.3.1.1. Detección de *Nosema* spp.

La detección simultánea de *N. apis* y *N. ceranae* por PCR convencional se realizó como se describe en Martín-Hernández *et al.* (2012). Para ello, se utilizaron placas comerciales gelificadas de 96 pocillos (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España) que contenían la ADN polimerasa *HotSplit* (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, España), 0,4  $\mu$ M de cada cebador, 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l de BSA, 0,1% de Triton X-100 que se reconstituyeron con 22,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O calidad PCR (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos).

Las condiciones de amplificación consistieron en un primer paso de 10 minutos a 95°C; seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 68,1°C y 45 segundos a 72°C; más una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los fragmentos amplificados obtenidos se revelaron mediante electroforesis capilar en un *QLAxcel System®* (Qiagen, Hilden, Alemania)

utilizando el paquete comercial *QLA<sub>x</sub>cel DNA Screening*<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Alemania).

### 3.3.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Las reacciones realizadas por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) llevaron a cabo en placas de 384 pocillos en un termociclador *LightCycler*<sup>®</sup>480 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) (**Figura 13**) en un volumen final de 10  $\mu$ L.

Las reacciones en las que se utilizó sonda tipo *Taqman* para la detección de los microorganismos contenían 5  $\mu$ L de *LightCycler*<sup>®</sup>480 *Probes Master Mix* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), 3,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 0,3  $\mu$ M de cada cebador y 0,2  $\mu$ M de las sondas respectivas. El programa de amplificación de las qPCRs con sonda *TaqMan* consistió en una incubación inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60, y 1 segundo a 72°C, más un paso final de enfriamiento 30 segundos a 40°C. La temperatura de anillamiento fue variable para la detección de cada microorganismo y se detalla en su respectivo capítulo.

En el caso de las reacciones de qPCR con *SYBR Green*, se utilizaron 5  $\mu$ L de *LightCycler*<sup>®</sup>480 *SYBR Green I Master Mix* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), 3,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O y 0,3  $\mu$ M de cada cebador. el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C; y un paso final de enfriamiento de 30 segundos a 40°C; una curva de disociación a 95°C durante 5 segundos, 1 minuto a 65°C y un aumento progresivo hasta los 97°C para verificar la presencia de dímeros de cebadores o productos inespecíficos, seguida de un paso de enfriamiento de 30 segundos a 40°C.

En ambos casos, ya fuera con la utilización de sondas *TaqMan* o de *SYBR Green*, el ciclo de amplificación de cada muestra se analizó con el programa informático *LightCycler*<sup>®</sup> 480 *v1.5.1* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) utilizando el algoritmo estadístico *Second Derivate Maximum* para calcular el punto de cruce (*Crossing point*, Cp).



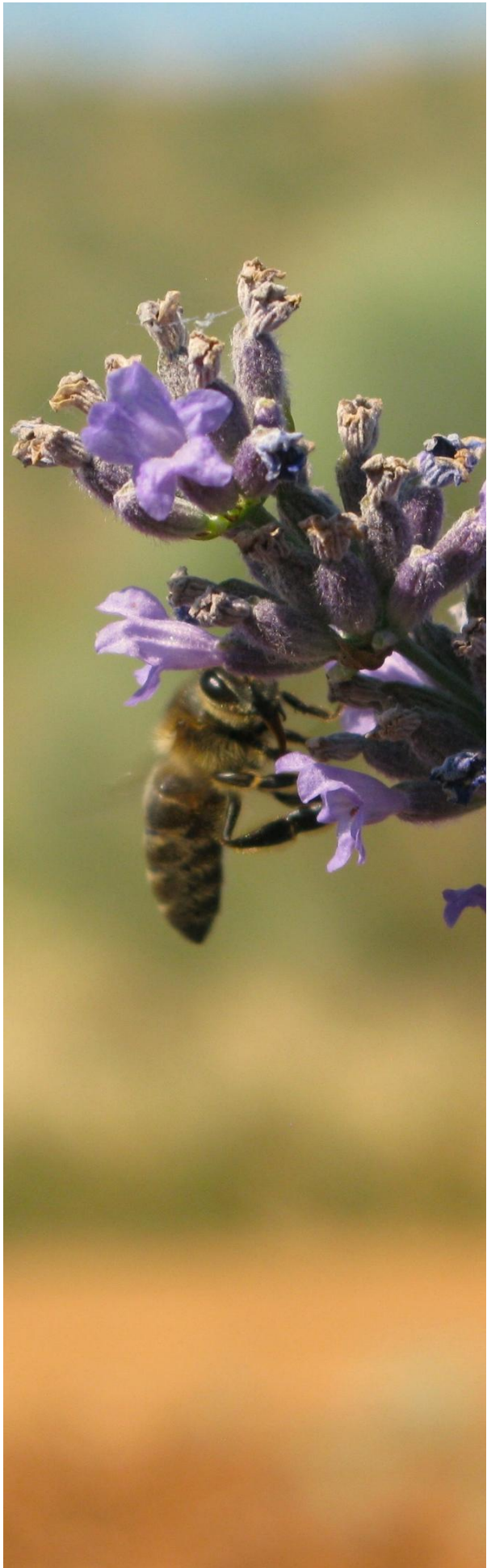
**Figura 13.** Termociclador de PCR convencional, a la izquierda; termociclador de qPCR, a la derecha. Fuente: original.





# CAPÍTULO I

**Comparación de métodos de extracción de ADN para la detección y cuantificación de bacterias intestinales y parásitos de abejas melíferas**





## **Comparación de métodos de extracción de ADN para la detección y cuantificación de bacterias intestinales y parásitos de abejas melíferas**

Artículo en preparación

La extracción de ADN es uno de los puntos críticos en biología molecular, ya que cualquier error en este punto tendrá efectos amplificados en los procedimientos posteriores. En este trabajo, se compararon diferentes protocolos de extracción de ADN para determinar el más eficaz para el análisis por PCR convencional y qPCR de parásitos (microsporidios y tripanosomátidos) y bacterias intestinales de las abejas. Se recogieron muestras de abejas adultas de 30 colonias, y cada una de ellas, compuesta por 60 abejas obreras. Las muestras se procesaron siguiendo 5 protocolos de extracción diferentes. Dos de ellos empleando el sistema automático *BioSprint*, basado en partículas magnéticas, con un paso previo de incubación con proteinasa K (BS+PK) o proteasa (BS+P). En los tres protocolos restantes, se utilizó el tampón Tris-EDTA (TE), dos de ellos con la adición de proteinasa K (TE+PK), y uno de estos con tampón de lisis ATL (TE+PK+ATL). También se analizó la conservación del ADN extraído con estos métodos tras 14 meses mantenido en congelación a -20°C. Los métodos de extracción más eficaces para la posterior detección y/o cuantificación para todos los microorganismos analizados fueron los realizados mediante el sistema automático. Sin embargo, el método TE, además de ser más rápido y económico, mostró resultados comparables a los métodos automáticos. El análisis de las muestras tras 14 meses en congelación mostró que el ADN permanece íntegro en aquellas extraídas mediante los métodos automáticos. Aunque en algunos casos se observó una disminución en la sensibilidad de detección, el método TE mostró que mantuvo una adecuada conservación del ADN.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas moleculares como la PCR convencional y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) son herramientas esenciales para la investigación de agentes patógenos ya que permiten la identificación y/o la medición de la abundancia del microorganismo diana. En este contexto, el diseño de protocolos que facilitan la detección y cuantificación de microorganismos que parasitan a las abejas es realmente importante para evaluar su distribución geográfica y su abundancia en las colonias, con el fin último de relacionarlo con las posibles repercusiones que tienen en la salud de las abejas.

Sin embargo, para realizar el análisis de muestras mediante estas técnicas se requiere de un paso previo de extracción de los ácidos nucleicos. Para la detección de la mayor parte de los patógenos (exceptuando los virus ARN) y las bacterias que forman parte de la microbiota, es necesaria la extracción del ADN. Esta fase supone un paso crucial, ya que la calidad y cantidad del ADN obtenido puede influir de manera notable en la precisión de los análisis posteriores y, en consecuencia, en los resultados experimentales. Por ello, la calidad y cantidad de éste debe ser lo más elevada posible para maximizar la sensibilidad en la detección y cuantificación mediante las técnicas moleculares anteriormente indicadas.

En la investigación de los patógenos y la microbiota intestinal de las abejas melíferas, son muchos los protocolos de extracción de material genético utilizados para el análisis de microsporidios (Cox-Foster *et al.* 2007; Paxton *et al.* 2007; Giersch *et al.* 2009; Martín-Hernández *et al.* 2012; Ansari *et al.* 2017; Urbietta-Magro *et al.* 2019a; Urbietta-Magro *et al.* 2019b; Arismendi *et al.* 2020), tripanosomátidos (Stevanovic *et al.* 2011; Vejnovic *et al.* 2018; Bartolomé *et al.* 2018; Quintana *et al.* 2021; Bordin *et al.* 2022) y bacterias intestinales (Anderson *et al.* 2016; Kešnerová *et al.* 2020; Castelli *et al.* 2022; Naree *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2021). Sin embargo, en muchos casos, los laboratorios utilizan los mismos métodos para diferentes microorganismos sin realizar un estudio previo que demuestren su eficacia específica para cada uno, ya que no todos los métodos de extracción de ADN son igualmente eficaces para todos los tipos de microorganismos. De hecho, en un estudio previo de nuestro laboratorio (Rodríguez-García *et al.* 2014), ya se observó que había variación en la eficacia

entre diferentes métodos de extracción de ADN para la detección de *N. ceranae*. Esto resalta la necesidad de, por un lado, comprobar su adecuación para cada microorganismo y, por otro, la búsqueda de procedimientos que garanticen una extracción eficiente para diversos microorganismos. Esto no sólo facilitaría un análisis más preciso, sino que también optimizaría el uso de tiempo y recursos en la investigación.

Otro aspecto importante es la estabilidad del ADN obtenido mediante el método de extracción utilizado, que debe garantizar la integridad y permitir su reutilización en análisis posteriores. De esta manera, es posible realizar análisis en el futuro sin necesidad de extraer muestras nuevas.

## 2. OBJETIVOS

A la vista de la importancia de seleccionar de forma adecuada el método de extracción de ADN de las muestras para su posterior análisis molecular, se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la eficacia de cinco protocolos de extracción de ADN para la detección y cuantificación de bacterias y parásitos intestinales de las abejas melíferas.
- Analizar la estabilidad del ADN extraído con estos cinco métodos tras un periodo de almacenamiento para verificar su idoneidad para un nuevo análisis.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Muestras de abejas

En noviembre de 2020, se muestrearon abejas adultas de 30 colonias ubicadas en dos colmenares experimentales del Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA) de Marchamalo, España. Las muestras se procesaron utilizando diferentes protocolos de extracción del material genético. Posteriormente, se analizaron por PCR convencional y por qPCR para la detección de bacterias de la microbiota intestinal de las abejas (*Ba. apis* y *F. perrara*), de microsporidios (*N. ceranae* y *N. apis*) y tripanosomátidos (*L. passim*) con el objetivo de seleccionar el método de extracción más adecuado a cada uno de estos microorganismos y evaluar la posibilidad de utilizar muestras almacenadas en el CIAPA para estudios posteriores.

Se recogieron unas 150 abejas según se describe en la **Metodología general**, las cuales fueron transportadas al laboratorio de forma inmediata y conservadas en  $-80^{\circ}\text{C}$  para garantizar la conservación del ADN hasta el momento de su procesado.

Adicionalmente, se incluyó un segundo lote de muestras de 30 colonias previamente confirmadas como positivas a *L. passim*.

### 3.2. Procesado de las muestras

De cada colmena se tomó una submuestra de 60 abejas obreras, que se procesaron de forma colectiva como se indica en el apartado **Metodología general**. En este caso, se introdujeron en bolsas estériles con 10 mL de agua calidad PCR (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos). Se preparó un blanco como control negativo de extracción, al que se añadió únicamente agua calidad PCR y se procesó en paralelo.

### 3.3. Extracción de ADN

De cada macerado obtenido se tomaron 600  $\mu\text{L}$  que se dispensaron en tubos individuales con perlas de cerámica (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), almacenando el excedente a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los tubos se agitaron en un *MagNaLyser* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) durante 95 segundos a 7000 rpm para facilitar la lisis de las bacterias intestinales y parásitos a estudiar (microsporidios y tripanosomátidos). Tras la lisis, una alícuota de cada macerado resultante se pasó a una placa de 96 pocillos y se procesó por los distintos métodos que se indican a continuación. El esquema general de los diferentes protocolos se muestra en la **Figura 14**.

#### 3.3.1. Sistema de extracción automática

El material genético se extrajo incubando 150  $\mu\text{L}$  de muestra de dos formas diferentes que se describen a continuación:

**Método BS+PK:** el volumen mencionado de cada muestra se transfirió a una placa *Deppwell* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se añadieron 30  $\mu\text{L}$  de tampón ATL (Qiagen, Hilden, Alemania) y 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania) a cada muestra. La placa se selló con una película plástica y se incubó a  $56^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 12 horas a 300 rpm (Martín-Hernández *et al.* 2012). Posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$

de tampón AL, 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol y 30  $\mu\text{L}$  de partículas magnéticas *MagAttract Susp G* (Qiagen, Hilden, Alemania). La extracción y purificación del ADN se realizó mediante el sistema automático *BioSprint* con el paquete comercial *BioSprint® 96 DNA Blood Kit* y usando el programa *BS96 DNA Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania).

**Método BS+P:** en este caso, a cada muestra se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de tampón AL y 15  $\mu\text{L}$  de proteasa (Qiagen, Hilden, Alemania). La placa se selló y se incubó a 70°C durante 10 minutos a 300 rpm. Una vez finalizada la incubación, la extracción y purificación del ADN se realizaron utilizando el mismo programa que el método BS+PK, arriba mencionado.

El material genético ya extraído se conservó a -20°C hasta su análisis molecular.

### 3.3.2. Tampón Tris-EDTA

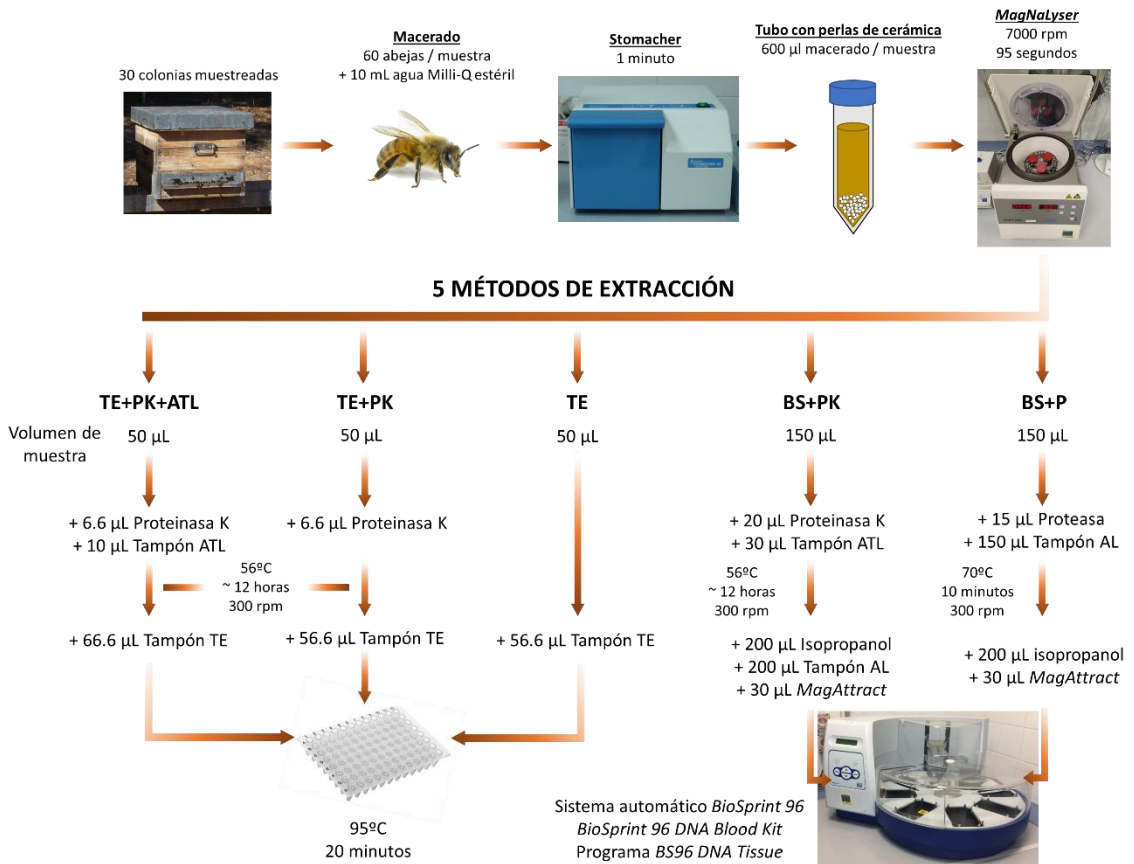
Con este protocolo, se realizaron 3 extracciones de ADN utilizando 50  $\mu\text{L}$  de muestra en cada una de ellas:

**Método TE:** a cada una de las muestras se le añadieron 50  $\mu\text{L}$  de tampón Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) en proporción 1:1 que se incubaron a 95°C durante 20 minutos.

**Método TE+PK:** en este método, en primer lugar, se adicionó 6,6  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania) por muestra. La placa se selló posteriormente con una película plástica y se incubó a 56°C durante aproximadamente 12 horas a 300 rpm. Terminada esta incubación, se añadieron 56,6  $\mu\text{L}$  de tampón TE a cada muestra (proporción 1:1). Posteriormente, se realizó una segunda incubación igual que la descrita en el método TE.

**Método TE+PK+ATL:** en este protocolo, además de añadir 6,6  $\mu\text{L}$  de proteinasa K, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis ATL recomendado por el fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania) por muestra y se incubaron a 56°C durante aproximadamente 12 horas a 300 rpm. Posteriormente, se añadieron 66,6  $\mu\text{L}$  de tampón TE a cada muestra (proporción 1:1) y se incubaron igual que en el método TE.

Una vez se tuvieron todas las muestras procesadas mediante los diferentes protocolos, se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis molecular.



**Figura 14.** Esquema de los diferentes protocolos de extracción de ADN utilizados para el procesado de las muestras, volumen de muestra utilizado en cada uno de ellos, volúmenes de reactivos añadidos a las muestras y tiempos de incubación.

### 3.4. Análisis molecular

Tras la extracción del ADN por cada uno de los métodos descritos, se procedió a la detección simultánea de *N. apis* y *N. ceranae* mediante la técnica de PCR convencional descrita por Martín-Hernández *et al.* (2012); mientras que para la detección de *L. passim* se utilizó la técnica descrita por Stevanovic *et al.* (2016). Para la detección y cuantificación mediante qPCR, se utilizaron los cebadores específicos para bacterias intestinales descritos por Kešnerová *et*

*al.* (2017), para *N. ceranae* (Urbieta-Magro *et al.* 2019b) y para *L. passim* (Buendía-Abad, Martín-Hernández y Higes 2023) (**Tabla 2**).

Técnica	Especie	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Referencia	
PCR	<i>N. ceranae</i>	MITOC-FOR	CGGCGACGATGTGATATGAAAAATATTAA	Martín-Hernández <i>et al.</i> (2012)	
		MITOC-REV	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG		
	<i>N. apis</i>	APIS-FOR	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA		
		APIS-REV	GGGGGGCGTTTTAAAAATGTGAAACAACCTATG		
	<i>L. passim</i>	LpCytb_F1	CGAAGTGCACATATATGCITTTAC		Stevanovic <i>et al.</i> (2016)
		LpCytb_R	GCCAAACACCAATAACTGGTACT		
qPCR	<i>N. ceranae</i>	PTP3-F	TGCTGATGTTATGGCTACAGAAG	Urbieta-Magro <i>et al.</i> (2019b)	
		PTP3-R	TACAGATTGCGCTGCTTTAA		
		PTP3-P	GCCAGGAA (UPL #72)		
	<i>Ba. apis</i>	Bart-F	GTGGGAATCTACCTATTTCTACG	Kešnerová <i>et al.</i> (2017)	
		Bart-R	AACGCGGGCTCATCTATCTC		
	<i>F. perrara</i>	Frisch-F	GGAAGTTATGTGTGGGATAAGC		
		Frisch-R	CTATTCTCAGGTTGAGCCCG		
	<i>L. passim</i>	qLpass_TOPII_F	GGCCATGGAAATACTCGAGTCT	Buendía-Abad <i>et al.</i> (2023)	
		qLpass_TOPII_R	ACCTTGCCCTTCCTTCTTGAGATT		
		qLpass_TOPII_P	6FAM-CCTCGACACGC+T+TA+GT-BHQ1		

**Tabla 2.** Cebadores y sondas empleadas en la detección de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos por las diferentes técnicas de PCR.

El protocolo para la detección de *N. apis* y *N. ceranae* por PCR convencional, así como la visualización de los fragmentos amplificados, se encuentra descrito en la **Metodología general**. En cuanto a las reacciones para la detección de *L. passim*, cada reacción contenía 12,5 µL de la enzima *FastStart PCR Master®* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) y 0,5 µM de cada cebador, utilizando las mismas condiciones que para *Nosema* spp., aunque utilizando una temperatura de anillamiento fue de 55°C.

La detección y cuantificación por qPCR de *N. ceranae* y *L. passim* por qPCR se realizó con sondas *TaqMan* específicas, mientras que para las bacterias intestinales se utilizó *SYBR Green*, siguiendo los protocolos descritos en la **Metodología general**. Sin embargo, en el caso de *L. passim*, la temperatura de anillamiento era de 61°C.

### 3.4.1. Evaluación del volumen de extracto de ADN

Para los análisis moleculares, se utilizaron diferentes volúmenes de extracto de ADN para las correspondientes determinaciones por PCR (**Tabla 3**). Para la PCR convencional se emplearon 2,5  $\mu\text{L}$ , que es el volumen estandarizado en el laboratorio de patología del CIAPA para la detección de microsporidios (Martín-Hernández *et al.* 2012). Dado que el volumen de muestra inicial en los métodos BS (150  $\mu\text{L}$ ) era tres veces mayor que en el método TE (50  $\mu\text{L}$ ), y el volumen de elución era el mismo en ambos casos (100  $\mu\text{L}$ ), fue necesario ajustar el volumen de ADN utilizado en cada PCR para comprobar si la concentración final de ADN influía en la sensibilidad del método analítico (volumen ajustado). Por tanto, para calcular el volumen de ADN en el método TE, se multiplicó por 3 el volumen de utilizado en los métodos BS. Aunque el volumen de muestra fue el mismo que en el método TE, el volumen de solución final fue mayor en los métodos TE+PK (113  $\mu\text{L}$ ) y TE+PK+ATL (133  $\mu\text{L}$ ). Por lo tanto, se multiplicó el volumen de ADN utilizado en el método TE por 1,13 y 1,33 para determinar el volumen de extracto de ADN para los métodos TE+PK y TE+PK+ATL, respectivamente.

En el caso de la qPCR, la técnica estandarizada en el Laboratorio de Patología del CIAPA (Urbietta-Magro *et al.* 2019b) utiliza 5  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  (proporción 1:4). Para mantener esta proporción y dado que todas las qPCRs en este estudio se realizarían a 10  $\mu\text{L}$  de volumen final, se utilizaron 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN. Este volumen también se utilizó para bacterias intestinales y para tripanosomátidos. Sin embargo, para bacterias intestinales y tripanosomátidos, el Laboratorio de Patología tiene estandarizada la técnica de qPCR con un volumen final de reacción a 10  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN, por lo que este volumen también se utilizó para detectar y cuantificar *N. ceranae*. Con este último volumen se realizó el ajuste para los métodos TE como se ha descrito anteriormente para PCR convencional.

Método	PCR convencional		qPCR	
	Volumen estandarizado ( $\mu\text{L}$ )	Volumen ajustado ( $\mu\text{L}$ )	Volumen estandarizado ( $\mu\text{L}$ )	Volumen ajustado ( $\mu\text{L}$ )
<b>BS + PK</b>	2,5	-	2,5	1
<b>BS + P</b>	2,5	-	2,5	1
<b>TE</b>	2,5	7,5	2,5/1	3
<b>TE + PK</b>	2,5	8,25	2,5/1	3,3
<b>TE + PK + ATL</b>	2,5	10	2,5/1	4

**Tabla 3.** Volúmenes de muestra estandarizados en el Laboratorio de Patología Apícola y volúmenes de ADN ajustados tras el ajuste para cada método de extracción para PCR convencional y qPCR para un volumen de reacción final de 25  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

A lo largo de todos los procesos se incluyeron controles negativos de extracción y PCR para descartar posibles contaminaciones. Igualmente, se incluyó un control positivo de muestras previamente confirmadas para cada uno de los microorganismos estudiados en cada PCR para confirmar el correcto funcionamiento de la técnica.

Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado, para confirmar la sensibilidad y la repetibilidad de cada método y volumen de ADN utilizado mediante las técnicas descritas. En todos los casos, si al menos uno de los replicados de las muestras analizadas resultó positivo, dicha muestra se consideró positiva. La repetibilidad se calculó en base al número de muestras que fueron positivas en cada uno de los replicados.

### 3.4.2. Conservación del ADN

Transcurridos 14 meses desde el análisis molecular, se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras positivas a los microorganismos analizados extraídas por cada método para realizar una comprobación de la estabilidad del ADN almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En este caso, el análisis de las 10 muestras se llevó a cabo utilizando únicamente 2,5  $\mu\text{L}$  para PCR convencional y 1  $\mu\text{L}$  para qPCR.

### 3.5. Análisis estadísticos

En el caso de la técnica de qPCR, la eficacia de cada método de extracción se evaluó comparando los valores de  $C_p$  obtenidos de los análisis realizados. Para ello, se realizaron comparaciones múltiples utilizando la

prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. En caso de significación, se aplicó la prueba Mann-Whitney con corrección de Bonferroni para las comparaciones por pares, considerando el uso de 1  $\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  o el volumen ajustado de ADN molde.

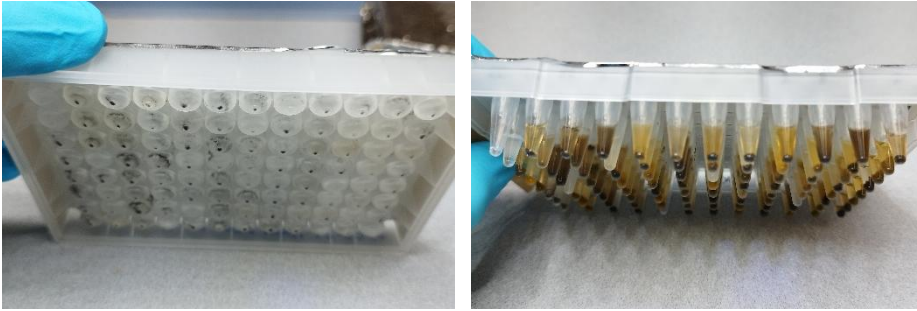
De la misma manera, se utilizaron los valores de  $C_p$  obtenidos en la comparación de los volúmenes utilizados para cada método de extracción y se compararon para determinar su influencia en la cuantificación. Se realizaron comparaciones por pares con la prueba no paramétrica Mann-Whitney con corrección de Bonferroni para ver si había diferencias en la utilización de 1  $\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{L}$  o el volumen ajustado de ADN molde. De la misma manera, se compararon los valores de  $C_p$  del primer análisis con el realizado 14 meses después de las 10 muestras positivas a cada especie para comprobar la estabilidad del ADN tras un largo período de tiempo almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos. Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa informático *IBM® SPSS® Statistics 25.0*.

#### 4. RESULTADOS

En los todos los controles negativos, tanto de la fase de extracción como de PCR, no hubo amplificación para las especies analizadas, descartando por tanto contaminación durante todo el proceso. En los controles positivos de cada una de las especies se registró amplificación de la manera esperada sin detectar amplificaciones inespecíficas, confirmándose el funcionamiento de la técnica de la forma adecuada.

La observación del extracto de ADN por cada método mostró diferencias características. En el caso de los métodos automáticos, el extracto de ADN se mostraba de un color claro y sin residuos, debido a que esta técnica incluye un paso de purificación de ADN. En cambio, el ADN extraído con los métodos basados en el tampón TE presentó una apariencia diferente ya que en estos métodos no se realiza ninguna purificación y el material genético en suspensión se encuentra junto con otros componentes de la muestra como restos celulares, partículas, proteínas, etc. (**Figura 15**).



**Figura 15.** Muestras extraídas con los métodos automáticos (izquierda) y con los métodos basados en el tampón TE (derecha). Fuente: original.

## 4.1. Microsporidios

Ninguna de las 30 muestras analizadas fue positiva a *N. apis*, y 11 de ellas fueron negativas también a *N. ceranae* en PCR convencional como en qPCR, por lo que se consideraron verdaderas negativas.

### 4.1.1. PCR convencional

Los métodos que permitieron detectar por esta técnica un mayor número de muestras positivas a *N. ceranae*, y que por lo tanto mostraron mayor eficacia, fueron los métodos automáticos y el método TE+PK+ATL, con el 63,3% de las muestras positivas utilizando 2,5  $\mu$ L de extracto de ADN. Con estos tres métodos se registraron amplificaciones en todos los replicados, a excepción del método BS+P, que tuvo una repetibilidad del 96,6%.

Los métodos TE y TE+PK permitieron la detección de *N. ceranae* en el 60% y el 50% de las muestras, respectivamente. Con el método TE, la repetibilidad fue del 93,3%, mientras que con el método TE+PK fue del 90%.

Con los volúmenes de ADN ajustados, la sensibilidad de la PCR y la repetibilidad se mantuvo con el método TE y mejoró con el método TE+PK, permitiendo la detección de *N. ceranae* en el 56,6% de las muestras con una repetibilidad del 93,3%. En cambio, con el método TE+PK+ATL, que fue de los más eficaces con 2,5  $\mu$ L, no se registró ninguna muestra positiva a *N. ceranae*.

Muestra	2,5 µL					Volúmenes ajustados								
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE						
174	+	+	+	+	+	-	+	+						
302	+	+	+	+	+	-	+	+						
176	-	-	-	-	-	-	-	-						
172	+	+	-	+	+	-	+	-						
177	+	+	+	+	+	-	+	+						
303	+	+	-	+	+	-	-	-						
178	+	+	+	+	+	-	+	+						
179	+	+	+	+	+	-	+	+						
180	+	+	-	+	+	-	+	+						
305	-	-	-	-	-	-	-	-						
185	+	+	+	+	+	-	+	+						
186	+	+	+	+	+	-	+	+						
187	+	+	+	+	+	-	+	+						
188	+	+	+	+	+	-	+	+						
312	+	+	+	+	+	-	-	+						
18	+	+	+	+	+	-	+	+						
20	+	+	+	+	+	-	+	+						
23	-	-	-	-	-	-	-	-						
3	-	-	-	-	-	-	-	-						
56	+	+	-	+	+	-	+	+						
4	+	+	+	+	+	-	+	+						
57	-	-	-	-	-	-	-	-						
2	-	-	-	-	-	-	-	-						
59	+	+	-	-	+	-	-	-						
10	-	-	-	-	-	-	-	-						
6	-	-	-	-	-	-	-	-						
14	-	-	-	-	-	-	-	-						
29	+	+	-	+	+	-	+	+						
26	-	-	-	-	-	-	-	-						
15	-	-	-	-	-	-	-	-						
Positivos por réplica	19	19	12	15	18	16	19	19	0	0	16	16	17	17
Positivos totales	19		15		18		19		19		0		17	

**Tabla 4.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción por PCR convencional.

### 4.1.2. qPCR

#### Detección

Utilizando 2,5 µL de ADN, los métodos BS+PK, BS+P y TE permitieron la detección del microsporidio en el 63,3% de las muestras, mientras que con el método TE+PK solo se logró la detección en el 43,3% de las muestras. La repetibilidad con los métodos automáticos fue del 100% pero en el caso del método TE fue del 80% y con el método TE+PK del 76,6%. Con el método TE+PK+ATL no se registró ninguna muestra positiva. (Tabla 5).

Al realizar los análisis con 1 µL de extracto de ADN, los métodos con los que se registró un mayor número de muestras positivas fueron,

nuevamente, los métodos automáticos (BS+PK y BS+P) y el método TE, junto con el método TE+PK+ATL, con los que se detectó *N. ceranae* en el 63,3% de las muestras. La repetibilidad de estos métodos fue del 100%, 96,6%, 93,3% y 70%, respectivamente. El método que mostró ser el menos eficaz fue el método TE+PK, que permitió la detección de *N. ceranae* en el 53,3% de las muestras (**Tabla 5**).

Muestra	2,5 µL					1 µL				
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P
174	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
302	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
176	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
172	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
177	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
303	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
178	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
179	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
180	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
185	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
186	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
187	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
188	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
312	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
18	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Positivos por réplica	0 0	9 10	16 16	19 19	19 19	12 17	16 15	18 18	19 19	18 19
Positivos totales	0	13	19	19	19	19	16	19	19	19

**Tabla 5.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

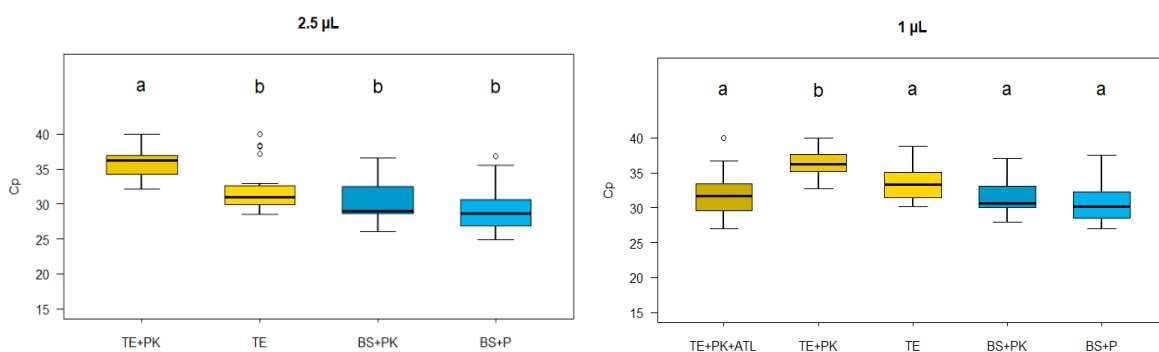
### Cuantificación

Al analizar los valores de Cp utilizando 2,5 µL de ADN, se observaron diferencias significativas entre los diferentes métodos de extracción (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Los métodos automáticos junto con el método TE permitieron obtener valores de Cp significativamente más bajos, lo cual indica mayores cargas de ADN, aunque no se observaron diferencias significativas entre ellos (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, el método con el que se

registraron los valores de  $C_p$  más altos, fue el método TE+PK (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) (**Figura 15**).

Al utilizar 1  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN, también se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Con los métodos TE+PK+ATL, TE y los dos métodos automáticos, se registraron los valores de  $C_p$  significativamente más bajos, sin diferencias significativas entre ellos (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). De nuevo, el método TE+PK fue el método con los valores de  $C_p$  significativamente más altos en comparación con el resto de los métodos (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) (**Figura 16**).

Al comparar los valores de  $C_p$  obtenidos al utilizar 2,5  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$  de ADN en cada uno de los métodos de extracción, no se observaron diferencias significativas, por lo que el volumen de ADN utilizado no afectó a la carga parasitaria independientemente del método de extracción utilizado (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).



**Figura 16.** Valores de  $C_p$  de *N. ceranae* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizado. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

## 4.2. Bacterias intestinales

### 4.2.1. *Bartonella apis*

#### Detección

Los resultados obtenidos en la detección de *Ba. apis* se muestran en la **Tabla 6**. Los métodos de extracción que ofrecieron una mayor eficacia para la

detección de *Ba. apis* fueron los métodos automáticos y el método TE, con los que se detectó esta bacteria en el 100% de las muestras y que presentaron una repetibilidad del 100%, utilizando tanto 2,5  $\mu\text{L}$  como 1  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, con el método BS+P, en una de las muestras no se mostró amplificación en ninguno de los replicados cuando se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de ADN. En cuanto al método TE, cuando se utilizaron los volúmenes ajustados, se observó una disminución de la sensibilidad de la PCR y de la repetibilidad, detectando la bacteria en el 83,3% de las muestras con una repetibilidad del 93,3%.

El siguiente método en términos de eficacia fue el método TE+PK, con el que se registró el 96,6% de las muestras positivas con una repetibilidad del 93,3% cuando se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN, y en el 73,3% de las muestras con una repetibilidad del 90% cuando se utilizaron 2,5  $\mu\text{L}$ . En cambio, con los volúmenes ajustados, la sensibilidad de la PCR mejoró logrando detectar la bacteria en el 96,6% de las muestras y manteniendo la repetibilidad.

La extracción con el método TE+PK+ATL no permitió la detección de *Ba. apis* en ninguna muestra cuando se utilizaron 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN ni con los volúmenes ajustados. Solo al utilizar 1  $\mu\text{L}$  de ADN se observaron muestras positivas en el 50% de las muestras con una repetibilidad del 70%.

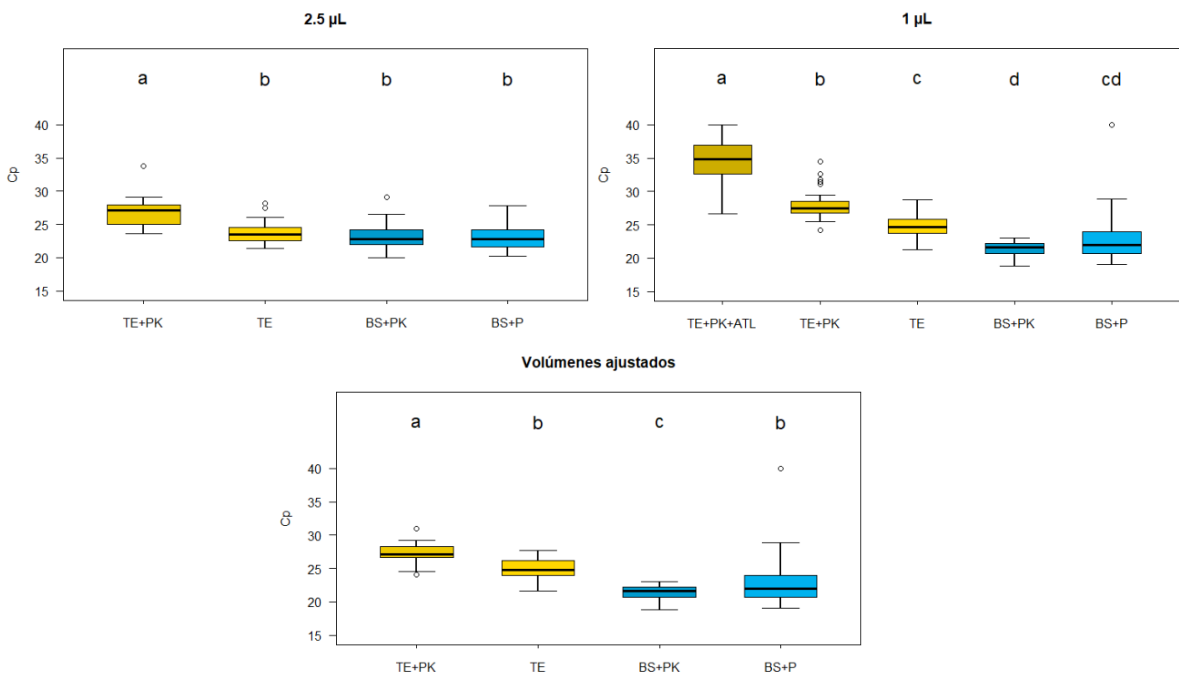
Muestra	2,5 µl				1 µl				Volúmenes ajustados						
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE		
174	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-		
302	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-		
176	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-		
172	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
177	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
303	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
178	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
179	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
180	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
305	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
185	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
186	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
187	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
188	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
312	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
18	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
20	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
23	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
56	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
4	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
57	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
2	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
59	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
10	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
14	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
29	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
26	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
15	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
Positivos por réplica	0	0	21	20	30	30	9	12	29	27	30	30	29	25	23
Positivos totales	0	0	22	20	30	30	15	15	29	29	0	29	29	25	25

**Tabla 6** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *Ba. aphisa* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

### Cuantificación

Cuando nos fijamos en los valores de Cp, se observaron diferencias significativas entre los diferentes métodos en todos los volúmenes de extracto de ADN utilizados (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Los métodos con los que se registraron los menores valores fueron los métodos automáticos independientemente del volumen de muestra utilizado (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Con el método TE, utilizando 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN, no se mostraron diferencias en la carga bacteriana en comparación con los métodos automáticos (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ), ni tampoco con el método BS+P utilizando 1  $\mu\text{L}$  ni con los volúmenes ajustados (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ). El método menos sensible fue el método TE+PK+ATL seguido del método TE+PK (Figura 17).

No se observaron diferencias significativas en los valores de Cp de cada método al compararlos con los diferentes volúmenes utilizados (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).



**Figura 17.** Valores de Cp de *Ba. apis* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizado. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

#### 4.2.2. *Frischella perrara*

##### Detección

Cuando se utilizaron 2,5  $\mu\text{L}$  de ADN, el método más sensible fue el método BS+PK con el 100% de las muestras positivas, seguido del método BS+P, con el 96,6% de las muestras positivas, ambos con una repetibilidad del 100%. Con el método TE y TE+PK se mostró una considerable pérdida de la sensibilidad con este volumen, detectando la bacteria en el 63,3% y el 23,3% de las muestras, respectivamente.

Sin embargo, fue utilizando 1  $\mu\text{L}$  de ADN con los que se detectó un mayor número de muestras positivas, de tal manera que los métodos automáticos y el método TE permitieron la detección de *F. perrara* en el 100% de las muestras positivas. En cuanto a la repetibilidad, con los métodos automáticos se alcanzó el 96,6%, mientras que con el método TE fue del 90%. A continuación, se situó el método TE+PK con el 83,3% de las muestras positivas y una repetibilidad del 93,3%.

El método TE+PK+ATL no mostró ninguna muestra positiva a esta bacteria para ninguno de los volúmenes utilizados. (**Tabla 7**).

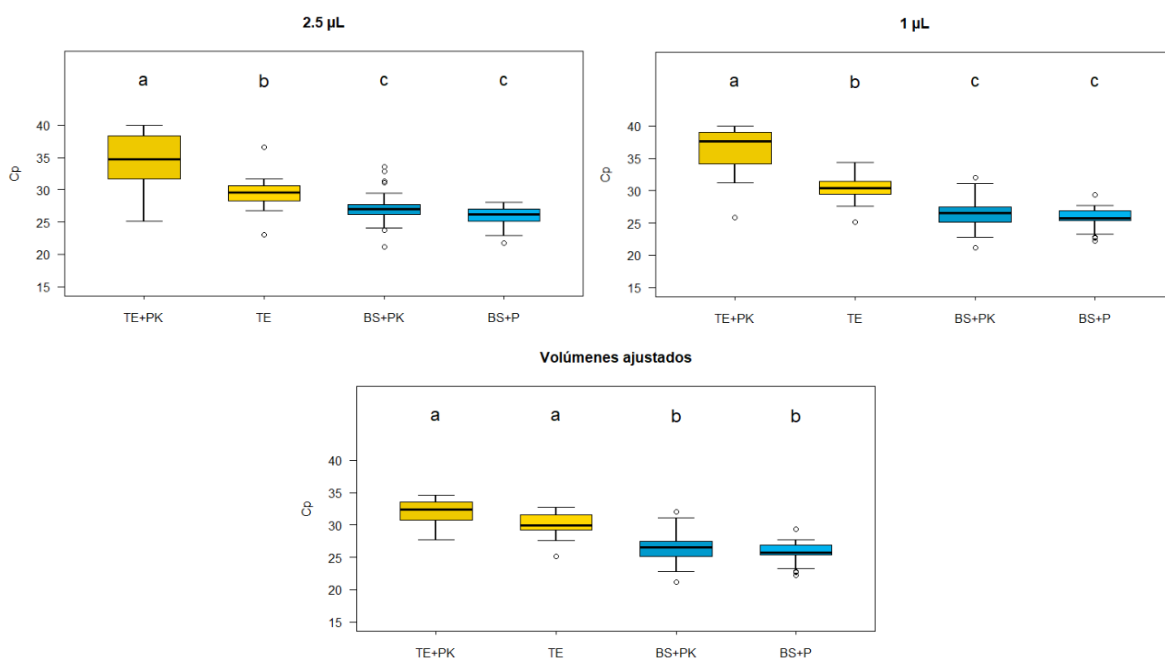
Muestra	2,5 µl					1 µl					Volumenes ajustados																	
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	TE + PK + ATL	TE + PK	TE												
174	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+												
302	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
176	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
172	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
177	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
303	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
178	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
179	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
180	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
305	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
185	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
186	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
187	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
188	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
312	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
18	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
20	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
23	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
3	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
56	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
4	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
57	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
2	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
59	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
10	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
6	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
14	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
29	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
26	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
15	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+												
Positivo por réplica	0	0	6	7	18	14	30	30	29	29	0	0	23	25	29	28	29	30	30	29	0	0	0	6	5	13	10	
Positivos totales	0	7	19	30	29	30	30	30	29	29	0	0	25	30	30	30	30	30	30	30	30	0	0	7	7	7	14	14

**Tabla 7.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *F. pernarra* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

## Cuantificación

En lo referido a los valores de  $C_p$ , independientemente del volumen utilizado, también se observaron diferencias significativas entre alguno de los métodos (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Los métodos con los que se obtuvieron valores de  $C_p$  significativamente menores fueron el BS+PK y BS+P (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ), indicando que mejoran la sensibilidad de la técnica de qPCR. El método TE no mostró diferencias significativas con el método TE+PK cuando se utilizó el volumen ajustado (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) (**Figura 18**).

No se observaron diferencias significativas en los valores de  $C_p$  de cada método al compararlos con los diferentes volúmenes utilizados (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ).



**Figura 18.** Valores de  $C_p$  de *F. perrara* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

### 4.3. *Lotmaria passim*

En el primer lote de 30 muestras, no se detectó la presencia de *L. passim*, ni por PCR convencional ni por qPCR. Por este motivo, se seleccionaron nuevas muestras procedentes de colonias que previamente habían sido confirmadas como positivas a *L. passim* utilizando la misma técnica de qPCR descrita en este estudio.

#### 4.3.1. PCR convencional

Los resultados obtenidos por PCR convencional revelaron que, al utilizar 2,5  $\mu$ L de ADN, los métodos BS+P y BS+PK ofrecieron los mejores resultados, permitiendo la detección *L. passim* en el 76,6% y el 73,3% de las muestras, respectivamente, con una repetibilidad del 93,3% y 80%.

En comparación, con el método TE se obtuvo amplificación en el 60% de las muestras, pero con una repetibilidad del 70%. Con los métodos TE+PK y TE+PK+ATL no se detectó *L. passim* en ninguna muestra con este volumen de ADN (**Tabla 8**).

Asimismo, con los métodos basados en el tampón TE no se detectó ninguna muestra positiva con los volúmenes ajustados (**Tabla 8**).

Muestra	2,5 µL					Volúmenes ajustados			
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	
PA19-0765	-	-	-	+	-	+	+	-	
PA19-0809	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA19-0813	-	-	-	-	+	+	+	-	
PA19-0861	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA20-0054	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA20-0295	-	-	-	+	-	-	-	-	
PA20-0302	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0304	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0306	-	-	-	+	+	-	+	-	
PA20-0312	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0314	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0343	-	-	-	-	+	+	+	-	
PA20-0653	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA20-0880	-	-	-	-	+	+	+	-	
PA20-0889	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0892	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0896	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA20-0898	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA21-0285	-	-	-	+	-	+	+	-	
PA21-0287	-	-	-	-	+	+	+	-	
PA21-0289	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA21-0292	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA21-0293	-	-	-	+	-	+	+	-	
PA21-0295	-	-	-	-	-	+	+	-	
PA21-0296	-	-	-	-	+	-	+	-	
PA21-0297	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA21-0298	-	-	-	+	+	+	+	-	
PA21-0318	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA21-0328	-	-	-	-	-	-	-	-	
PA21-0329	-	-	-	+	-	+	+	-	
Positivos por réplica	0	0	0	13	14	20	18	23	21
Positivos totales	0	0	18	22	23	0	0	0	0

**Tabla 8.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción por PCR convencional.

### 4.3.2. qPCR

#### Detección

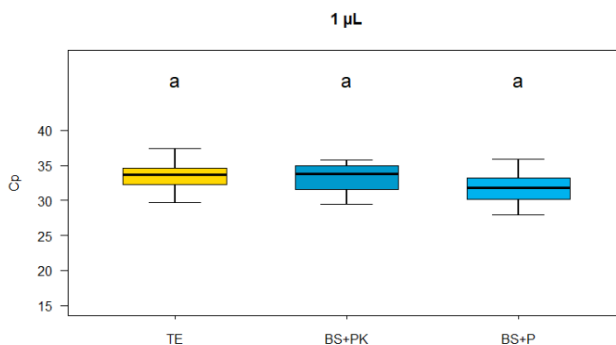
Cuando se utilizó la técnica de qPCR utilizando 2,5 µL de ADN, ninguna muestra fue positiva para ninguno de los métodos de extracción. De igual forma, cuando se utilizó 1 µL, con los métodos TE+PK+ATL y TE+PK no se detectó *L. passim* en ninguna muestra, tan solo los métodos TE y los dos métodos automáticos permitieron su detección. El método con el que se registró el mayor número de muestras positivas fue el método BS+P, con un 76,6% de las muestras positivas, seguido del método BS+P y el método TE, con los que se logró el 73,3% y 70% de las muestras positivas, respectivamente. En estos tres métodos la repetitividad fue de al menos del 96,6% (**Tabla 9**).

Muestra	2,5 $\mu$ L					1 $\mu$ L						
	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P	TE + PK + ATL	TE + PK	TE	BS + PK	BS + P		
PA19-0765	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
PA19-0809	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA19-0813	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA19-0861	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA20-0054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA20-0295	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA20-0302	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0304	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0306	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0312	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0314	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0343	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA20-0880	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0889	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0892	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0896	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA20-0898	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA21-0285	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0287	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0289	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0292	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0293	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0295	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0296	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0297	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0298	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
PA21-0318	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA21-0328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
PA21-0329	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
Positivos por réplica	0	0	0	0	0	0	0	21	20	22	22	23
Positivos totales	0	0	0	0	0	0	0	21	22	23		

**Tabla 9.** Número de positivos en cada replicado y de muestras positivas totales a *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción por qPCR.

### Cuantificación

Cuando se compararon los valores de Cp entre los tres métodos que permitieron la detección de *L. passim* no se observaron diferencias significativas (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ; **Figura 19**).



**Figura 19.** Valores de Cp de *L. passim* en cada uno de los métodos de extracción en función de los volúmenes de extracto de ADN utilizados. Los métodos que no registraron amplificación en ninguna muestra no se encuentran representados gráficamente.

Los resultados totales de las réplicas y del número de muestras positivas en cada método de extracción y de cada microorganismo se representa en la **Tabla 10**.

<i>N. ceranae</i>								
	PCR convencional				qPCR			
	2,5 µL		Volúmenes ajustados		2,5 µL		1 µL	
	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales
TE + PK + ATL	19   19	19	0   0	0	0   0	0	12   17	19
TE + PK	12   15	15	16   16	17	9   10	13	16   15	16
TE	18   16	18	17   17	18	16   16	19	18   18	19
BS + PK	19   19	19			19   19	19	19   19	19
BS + P	18   19	19			18   19	19	18   19	19

<i>L. passim</i>								
	PCR convencional				qPCR			
	2,5 µL		Volúmenes ajustados		2,5 µL		1 µL	
	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales
TE + PK + ATL	19   19	19	0   0	0	0   0	0	0   0	0
TE + PK	12   15	15	16   16	17	0   0	0	0   0	0
TE	18   16	18	17   17	18	13   14	18	0   0	0
BS + PK	19   19	19			20   18	22	19   19	19
BS + P	18   19	19			23   21	23	18   19	19

<i>B. apis</i>						
	qPCR					
	2,5 µL		1 µL		Volúmenes ajustados	
	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales
TE + PK + ATL	0   0	0	9   12	15	0   0	0
TE + PK	21   20	22	29   27	29	29   26	29
TE	30   30	30	30   30	30	25   23	25
BS + PK	30   30	30	30   30	30		
BS + P	30   30	30	29   29	29		

<i>F. perrara</i>						
	qPCR					
	2,5 µL		1 µL		Volúmenes ajustados	
	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales	Positivos por réplica	Positivos totales
TE + PK + ATL	0   0	0	0   0	0	0   0	0
TE + PK	6   7	7	23   25	25	6   5	7
TE	18   14	19	29   28	30	13   10	14
BS + PK	30   30	30	29   30	30		
BS + P	29   29	29	30   29	30		

**Tabla 10.** Tabla resumen con los recuentos totales de los replicados y muestras positivas para todos los microorganismos analizados en cada método de extracción.

## 4.4. Conservación del ADN

Para verificar la integridad del ADN en función del método de extracción, se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras positivas del primer análisis, las cuales se analizaron nuevamente 14 meses después de la extracción, tanto por PCR convencional utilizando únicamente 2,5  $\mu\text{L}$  de muestra como por qPCR utilizando 1  $\mu\text{L}$ .

### 4.4.1. PCR convencional

En cuanto a la detección por PCR convencional, las 10 muestras positivas resultaron nuevamente positivas a *N. ceranae* independientemente del método de extracción (**Tabla 11**).

Sin embargo, en lo referido a *L. passim*, la extracción con los métodos automáticos mantuvo el número de positivos, mientras que con el método TE se perdió sensibilidad en la PCR, registrando sólo el 60% de las muestras positivas. Las muestras extraídas con los métodos TE+PK+ATL y TE+PK no se volvieron a analizar para *L. passim* puesto que no hubo ninguna muestra positiva tras el primer análisis (**Tabla 11**).

Método	<i>N. ceranae</i>		<i>L. passim</i>	
	Nov-20	Ene-22	Nov-20	Ene-22
TE + PK + ATL	10	10	0	-
TE + PK	10	10	0	-
TE	10	10	10	6
BS + PK	10	10	10	10
BS + P	10	10	10	10

**Tabla 11.** Número de muestras positivas a *N. ceranae* y *L. passim* en el primer análisis y transcurridos 14 meses desde la extracción del ADN por PCR convencional.

### 4.4.2. qPCR

#### Detección

El análisis por qPCR tras 14 meses desde la extracción del ADN mostró que todas las muestras extraídas con el método automático, independientemente de si fueron incubadas con proteinasa K o proteasa, fueron positivas para todas las especies analizadas. No obstante, con los

métodos basados en el tampón TE, los resultados fueron algo más variados, con una pérdida de la sensibilidad de la qPCR en la mayoría de los casos.

Para *N. ceranae*, la extracción con los métodos TE+PK y TE permitió la detección del microsporidio en el 90% y 80% de las muestras, respectivamente, mientras que con el método TE+PK+ATL se detectó en el 70% (**Tabla 12**).

En el caso de *L. passim*, el 100% de las muestras volvieron a ser positivas independientemente del método de extracción (**Tabla 12**).

Para *Ba. apis*, los métodos TE+PK y TE volvieron a permitir su detección en todas las muestras seleccionadas, mientras que con el método TE+PK+ATL se observó cierta pérdida de la sensibilidad de la técnica analítica, detectando la bacteria en el 90% de las muestras. Para *F. perrara*, se observó una disminución en el número de positivos cuando las muestras se extrajeron con los métodos TE y TE+PK, detectándose en el 70% y el 40% de las muestras, respectivamente (**Tabla 12**).

Dado que en el primer análisis no hubo ninguna muestra positiva a *L. passim* en los métodos TE con incubación con proteinasa K ni a *F. perrara* en el método TE+PK, no se realizó el análisis de estas muestras (**Tabla 12**).

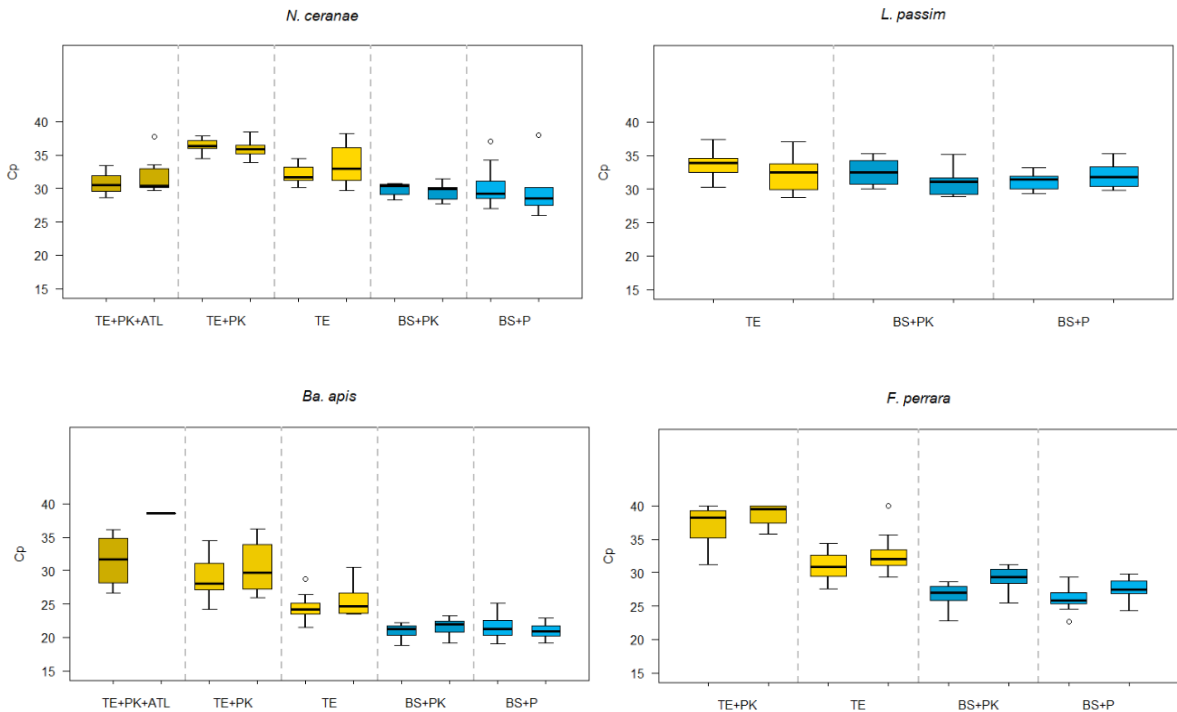
Método	<i>N. ceranae</i>		<i>L. passim</i>		<i>Ba. apis</i>		<i>F. perrara</i>	
	nov-20	ene-22	nov-20	ene-22	nov-20	ene-22	nov-20	ene-22
TE + PK + ATL	10	7	0	-	10	1	0	-
TE + PK	10	9	0	-	10	10	10	4
TE	10	8	10	10	10	10	10	7
BS + PK	10	10	10	10	10	10	10	10
BS + P	10	10	10	10	10	10	10	10

**Tabla 12.** Número de muestras positivas a bacterias intestinales, *N. ceranae* y *L. passim* en el primer análisis y transcurridos 14 meses desde la extracción del ADN por qPCR.

### Cuantificación

En cuanto a los valores de Cp, no se observaron diferencias significativas al analizar de nuevo las muestras 14 meses después de la

extracción, independientemente del método de extracción utilizado y de la especie analizada (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) (**Figura 20**).



**Figura 20.** Valores de  $C_p$  de *N. ceranae*, *L. passim* y bacterias intestinales en cada uno de los métodos de extracción tras 14 meses desde la extracción del ADN.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran la importancia de seleccionar adecuadamente el método de extracción del material genético de las muestras para que los métodos moleculares de detección y cuantificación resulten sensibles y repetibles, ya que no todos los métodos de extracción son igualmente eficaces para todos los microorganismos.

De forma general, al comparar todos los métodos de extracción de este estudio, independientemente del volumen de ADN utilizado, los que mostraron una mayor eficacia, atendiendo a la sensibilidad y a la repetibilidad de la técnica molecular realizada posteriormente, fueron los llevados a cabo

tras el procesado y extracción con el sistema automático *BioSprint*. De hecho, las diferencias fueron significativamente notables en comparación con los métodos basados en el tampón TE, especialmente cuando las muestras se incubaban previamente con proteinasa K.

El sistema automático *BioSprint* utiliza unas partículas magnéticas a las que se une el ADN. Posteriormente, mediante la presencia de un campo magnético, estas partículas en suspensión con el ADN adherido se eluyen en tampón AE. De esta manera, el ADN queda purificado, libre de contaminantes como proteínas, polisacáridos, lípidos, fenoles y otros metabolitos (Sidstedt, Rådström y Hedman 2020).

Por el contrario, el método de extracción mediante la utilización de tampón TE, consiste en una incubación a alta temperatura para lisar los componentes celulares mediante choque térmico, lo que facilita la liberación del material genético. Este tampón es una combinación de la base Tris, que proporciona capacidad de amortiguación para mantener un pH estable en las muestras biológicas; y EDTA, un quelante metálico que ayuda a inhibir la actividad de las nucleasas y enzimas dependientes de metales, lo que contribuye a mantener la estabilidad e integridad del ADN. Por estas propiedades, el tampón TE es ampliamente utilizado tanto en la extracción de ADN como en su almacenamiento. Sin embargo, la solución resultante no solo contiene el ADN, sino también contaminantes y restos celulares en solución que pueden actuar como inhibidores de la PCR (Ríos Sánchez *et al.* 2016; Sidstedt, Rådström y Hedman 2020). En nuestro trabajo, antes de realizar el análisis molecular, las muestras se centrifugaron brevemente para favorecer la sedimentación de gran parte de estas impurezas y solo se tomaba la parte superior del sobrenadante para ser añadido a la reacción de PCR, pero es muy probable que algunas permanecieran en suspensión. Esto explicaría por qué las técnicas moleculares que utilizan ADN extraído mediante el tampón TE muestran menor sensibilidad y repetibilidad. Este método se asemeja a la extracción con Chelex®, un método ampliamente utilizado en estudios genéticos de las abejas melíferas, sus parásitos y bacterias intestinales (De La Rúa *et al.* 2004; Muñoz *et al.* 2008; Fries *et al.* 2013; Bartolomé *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2021).

La proteinasa K y la proteasa utilizadas en los diferentes métodos de extracción descritos en el presente trabajo tienen la misma función, con la diferencia de que la proteinasa K es una proteasa de tipo subtilisina aislada del hongo *Tritirachium album*, mientras que la proteasa es una enzima de serina aislada de una cepa recombinante de una bacteria del género *Bacillus*. Estas enzimas se utilizan habitualmente (Martín-Hernández *et al.* 2007, 2012; Lopes *et al.* 2022; Urbietta-Magro 2019a; Buendía-Abad, Martín-Hernández y Higes 2023) para digerir las proteínas contaminantes presentes en la muestra, así como las que forman parte de las estructuras celulares, además de las nucleasas, lo que contribuyen a proteger el ADN durante el proceso de extracción. Además, el fabricante recomienda la incubación de la proteinasa K con el tampón ATL, un tampón optimizado para la lisis tisular.

Curiosamente, los métodos basados en el tampón TE combinados con una incubación con proteinasa K fueron los menos eficaces, a excepción del método TE+PK+ATL en el caso de *N. ceranae*. Los microsporidios poseen una doble pared celular, compuesta por la endospora y la exospora, lo que les confiere gran resistencia frente a condiciones adversas (Higes *et al.* 2007), como podría ser el aumento de la temperatura exterior. Por ello, el tratamiento con proteinasa K (o proteasa) podría haber facilitado la liberación de material genético, mientras que la incubación posterior con el tampón TE habría permitido completar la liberación del material genético de las esporas mediante el choque térmico. En el caso de las bacterias intestinales y *L. passim*, que no poseen formas de resistencia, sino que poseen una pared celular menos resistente que las esporas (Silhavy, Kahne y Walker 2010) y, en el caso de *L. passim*, únicamente una membrana plasmática (Landfear y Ignatushchenko 2001), es posible que solo la incubación con proteinasa K o proteasa, o con el tampón TE, sea suficiente para la lisis celular y la liberación del material genético. Esto sugiere que una doble incubación a temperaturas elevadas podría favorecer la degradación del ADN. Este factor, junto con la presencia de contaminantes e inhibidores de PCR, podría explicar por qué en el análisis de las muestras procesadas con los métodos basados en el tampón TE con una incubación con proteinasa K mostraron un menor número de muestras positivas en casi todos los casos, una menor repetibilidad y menores cargas microbianas en las muestras extraídas con estos métodos. Por tanto, se demuestra que la proteinasa K no añade ventajas al método TE.

De hecho, con el método de extracción en el que solo se incubaba la muestra con tampón TE se obtienen resultados comparables a los métodos automáticos en muchas ocasiones, tanto en términos de sensibilidad (número de muestras positivas) como en cargas microbianas. Este método ya ha mostrado ser eficaz para la detección de microsporidios de abejas y abejorros (Rodríguez-García *et al.* 2014) y es por ello por lo que es un método que se ha utilizado en diferentes estudios de nuestro grupo de investigación (Urbieta-Magro *et al.* 2019a, 2019b; Jabal-Uriel *et al.* 2022b, 2022c).

También hay que tener en cuenta que el coste económico de los métodos basados en el tampón TE es muy inferior a los métodos automáticos, que requieren de la compra de diferentes reactivos específicos de extracción de un coste elevado, además del propio equipo de extracción *BioSprint*. Además, la duración del proceso de extracción también es un factor importante para tener en consideración. El método de extracción que utiliza la incubación con tampón TE es el que menos tiempo requiere para la extracción del material genético tras el procesado de las abejas (20 minutos de incubación) en comparación con los métodos que requieren de la incubación con proteinasa K, que es de aproximadamente 12 horas, según la recomendación del fabricante. Por todo ello, el método TE es un método eficiente debido a su bajo coste, rapidez y calidad de los resultados obtenidos, siendo una buena opción cuando el presupuesto para realizar un estudio es ajustado y/o el número de muestras a analizar es muy elevado.

Hasta la actualidad, se han descrito numerosos protocolos de extracción de ácidos nucleicos aplicados tanto para el estudio genético de las abejas melíferas como para la caracterización molecular de diversos parásitos que las afectan y el análisis de las comunidades bacterianas presentes en su microbiota intestinal (De La Rúa *et al.* 2004; Muñoz *et al.* 2008; Stevanovic *et al.* 2011; Martín-Hernández *et al.* 2012; Vejnovic *et al.* 2018; Kešnerová *et al.* 2017; Urbieta-Magro *et al.* 2019b; Arismendi *et al.* 2020; Quintana *et al.* 2021; Naree *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2021). En el año 2015, se realizó un estudio multicéntrico y organizado por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea (*European Union Reference Laboratory*, EURL) para la salud de las abejas Sophia-Antipolis (Francia) con el fin de comparar los métodos moleculares utilizados en laboratorios de referencia de diferentes países europeos para la identificación de especies de *Nosema* (Duquesne *et al.* 2017). Cada laboratorio

debía procesar y analizar distintas alícuotas que contenían abdómenes triturados de abejas melíferas y abejorros infectados con microsporidios, tanto de forma natural como artificial, utilizando sus propios procedimientos rutinarios. Entre los 21 laboratorios de referencia, cada uno empleó un protocolo diferente, con variaciones en todas las etapas, desde la extracción del ADN hasta el análisis por PCR. Estas diferencias incluyeron el uso de diferentes kits comerciales, la realización de extracciones manuales o automatizadas, la variación en los volúmenes de muestra extraídos, los volúmenes de elución y el volumen de extracto utilizado para el análisis por PCR e incluso el uso de PCR convencional o qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que menos de la mitad de los laboratorios utilizaron técnicas que alcanzaron la especificidad y la sensibilidad esperadas. De hecho, más de la mitad de los laboratorios utilizaron los cebadores diseñados por nuestro grupo de investigación y que han sido utilizados en nuestro estudio para la detección molecular de *N. ceranae* y *N. apis* (Martín-Hernández *et al.* 2007). Sin embargo, a pesar de utilizar la misma técnica de detección, hubo variaciones en la sensibilidad del método analítico. Todo esto evidencia la necesidad de estandarizar protocolos en los que se utilicen métodos analíticos robustos, reproducibles y sensibles para la obtención de resultados fiables.

Esta falta de estandarización se ve agravada por la práctica común de aplicar un protocolo optimizado para un microorganismo específico (bacteria, hongo, protozoo, etc.) directamente a otro microorganismo diana, sin realizar pruebas adicionales que verifiquen su idoneidad para el nuevo microorganismo.

Otro factor de gran importancia a la hora de valorar la eficacia de un determinado protocolo de PCR es la cantidad y calidad de extracto de ADN utilizado para llevar a cabo la reacción. Aunque podría pensarse que más cantidad de extracto de ADN mejora la sensibilidad de la técnica analítica, la PCR puede detectar con precisión cantidades bajas de ADN o cuantificar la cantidad de un determinado patógeno microbiano (Sidstedt, Rådström y Hedman 2020). La calidad del ADN también es fundamental para garantizar el éxito del análisis molecular, ya que el extracto de ADN puede contener una variedad de contaminantes que actúan como inhibidores de la reacción de PCR. Entre los inhibidores más comunes se encuentran componentes de reactivos comúnmente utilizados para el procesado de muestras (detergentes),

compuestos orgánicos o fenólicos, grasas y el calcio. Otros inhibidores más extendidos incluyen componentes de celulares, ADN no diana y contaminantes, y elementos de laboratorio como polen, polvo, material plástico de laboratorio y celulosa (Wilson 1997; Schrader *et al.* 2012). Concretamente en lo referido a las abejas, la elevada cantidad de azúcares de la miel o el néctar (Lalmangaihi *et al.* 2014) o componentes presentes en los ojos de las abejas (Boncristiani *et al.* 2011) podrían actuar como inhibidores de la PCR. Por tanto, si el ADN no ha sido adecuadamente purificado y el volumen de extracto utilizado para llevar a cabo la PCR es excesivo, se incrementa la presencia de estos inhibidores, lo que provoca una disminución en la eficiencia de la amplificación (Boncristiani *et al.* 2011; Schrader *et al.* 2012; Sidstedt, Rådström y Hedman 2020; McDonald, Taylor y Linacre 2024). Esto explicaría que la utilización de volúmenes elevados (volúmenes ajustados) de los métodos basados en el tampón TE en los que se utilizaba una cantidad de extracto de ADN elevada fueran con los que se registraron los peores resultados tanto en PCR convencional como en qPCR.

También hay que destacar que el método de extracción influye en la conservación de las muestras, lo cual es otro factor clave en la selección del método de extracción. Se ha demostrado que la temperatura de almacenamiento y el tipo de tampón utilizado son determinantes en la preservación de la integridad del ADN a largo plazo (Murakami 2013). En particular, el tampón TE ha mostrado ser un solvente que mejora la conservación del ADN, mejorando su estabilidad en comparación con el uso exclusivo de agua (Murakami 2013). Además, la adición de glicerol contribuye a preservar mejor el ADN congelado, ya que previene la formación de cristales que pueden dañarlo (Schaudien, Baumgärtner y Herden 2007), y que podrían producir una falsa cuantificación en la técnica de qPCR en tiempo real (Röder *et al.* 2010). Asimismo, un método que mantenga la integridad del ADN permite aprovechar muestras de ensayos anteriores que pueden ser valiosas, especialmente cuando la recolección de nuevas muestras resulta complicada o cuando las condiciones experimentales no permiten la repetición del estudio. Además, contribuye a reducir la cantidad de abejas sacrificadas para la realización de nuevos ensayos, promoviendo un enfoque más ético.

Por otro lado, los ciclos de congelación y descongelación son un factor que afecta de manera significativa en la estabilidad del ADN (Ross, Haites y

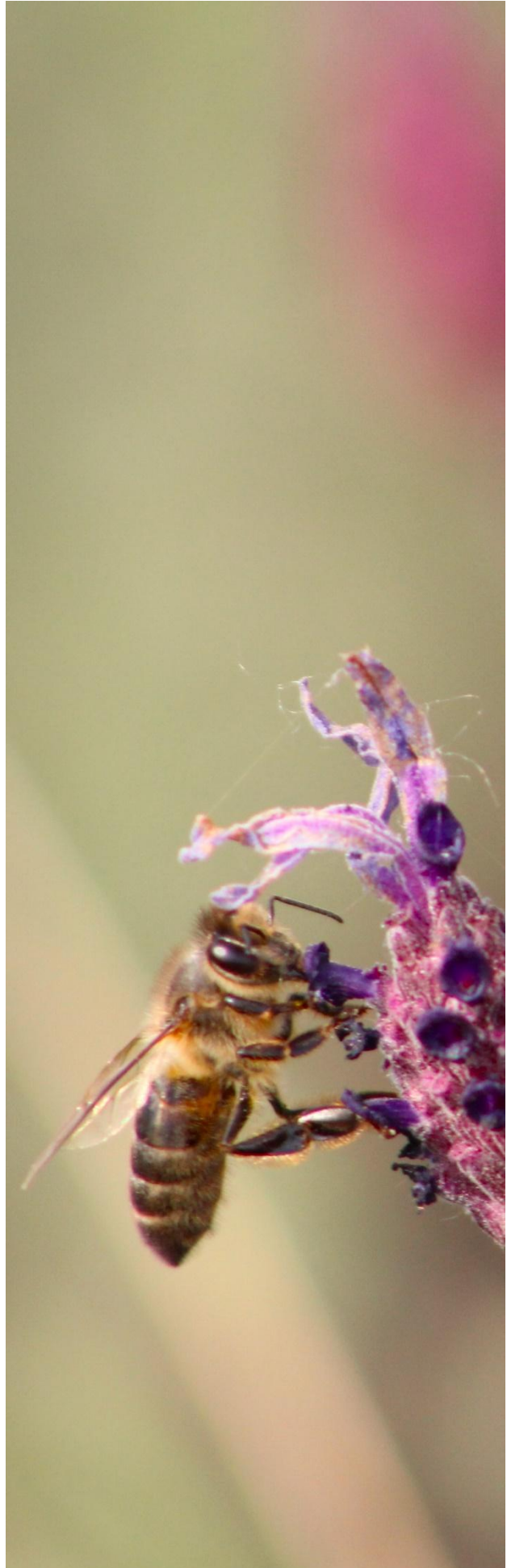
Kelly 1990; Villanueva, Podzorski y Reyes 1998; Kim 2003). Sin embargo, este impacto parece estar más relacionado con el volumen total en el que se almacena el ADN, ya que un mayor volumen de almacenamiento mantiene la integridad del ADN, incluso después de someterlo a múltiples ciclos de congelación y descongelación (Bellete *et al.* 2003). En nuestro caso, los ciclos de congelación y descongelación se intentaron minimizar siempre que fue posible para realizar los análisis moleculares.

Este trabajo, por lo tanto, establece una base sólida para seleccionar protocolos eficientes en la detección y cuantificación de microsporidios, tripanosomátidos y bacterias intestinales de las abejas melíferas, destacando la importancia de realizar pruebas preliminares para seleccionar el método de extracción de ADN que garantice un análisis molecular preciso. Además, se demuestra que las muestras de ADN debidamente conservadas y que son extraídas utilizando estos protocolos, pueden ser revalorizadas y reutilizadas para nuevos análisis, lo que permite su aplicación con otros objetivos científicos para los cuales no se habían considerado inicialmente.



## CAPÍTULO II

Prevalencia de tripanosomátidos en colonias de *Apis mellifera* de zonas geográficamente aisladas con movimientos apícolas restringidos





## Prevalencia de tripanosomátidos en colonias de *Apis mellifera* de zonas geográficamente aisladas con movimientos apícolas restringidos

En los últimos años, se ha detectado una elevada prevalencia de tripanosomátidos en las colonias de abejas en todo el mundo, siendo *L. passim* la especie predominante. Sin embargo, el conocimiento sobre su ecología en zonas aisladas es limitado. Por ello, se analizaron un total de 661 colonias de abejas melíferas ubicadas en Madeira y el archipiélago de las Azores mediante diferentes técnicas moleculares, a través de las cuales se halló una elevada prevalencia de tripanosomátidos. *L. passim* fue la especie predominante y, en la mayoría de las colonias, la única especie detectada. Este hecho se produjo incluso en islas libres de *V. destructor* y/o *N. ceranae*, las cuales cuentan con severas restricciones en los movimientos de las colonias entre islas y con prohibiciones en la importación de material apícola para evitar su propagación. El análisis de los datos reveló que las islas con presencia confirmada de *V. destructor* presentaron una prevalencia significativamente mayor de *L. passim* y que, por el contrario, la presencia *N. ceranae* no mostró ninguna asociación con la prevalencia de *L. passim*. *C. bombi* también se detectó en Madeira y en tres islas de las Azores, casi siempre coincidiendo con la detección de *L. passim*. En cambio, *C. mellificae* no se detectó en ninguna colonia analizada. La secuenciación de alto rendimiento distinguió dos haplotipos principales de *L. passim*, que representaban el 98% de las lecturas de secuencias totales. Este trabajo sugiere que *L. passim* y *C. bombi* son parásitos que han estado asociados a las abejas melíferas antes de la propagación de *V. destructor* y *N. ceranae*.

**Aguado-López, D.**, Bartolomé, C., Lopes, A. R., Henriques, D., Segura, S. K., Maside, X., Pinto, M. A., Higes, M. & Martín-Hernández, R. (2023). Frequent parasitism of *Apis mellifera* by trypanosomatids in geographically isolated areas with restricted beekeeping movements. *Microbial Ecology*, 86(4), 2655-2665.

<https://doi.org/10.1007/s00248-023-02266-y>

Artículo científico publicado en “*Microbial Ecology*”.

Publicado: 22 de julio de 2023.

## 1. INTRODUCCIÓN

La análisis de todos los datos moleculares obtenidos hasta 2015, año en el que *L. passim* se describió por primera vez (Schwarz *et al.* 2015), reveló que muchas secuencias se habían asignado incorrectamente a *C. mellificae*, poniendo de manifiesto que *L. passim* era la especie predominante en todo el mundo (Arismendi *et al.* 2016; Stevanovic *et al.* 2016; Hall *et al.* 2021). Así pues, estos datos sugieren que *L. passim* habría estado presente en las colonias de abejas melíferas mucho antes de su caracterización, aunque no existen pruebas científicas sobre si se trata de un nuevo parásito exótico y emergente de las abejas melíferas en diferentes zonas del planeta, que se ha extendido recientemente por todo el mundo, similar a *V. destructor* y *N. ceranae*, o si es un parásito que ha coevolucionado con *A. mellifera*.

Para evaluar estas hipótesis y estudiar la ecología y la dinámica de colonización de patógenos invasores, las islas ofrecen un escenario ideal debido al aislamiento geográfico de las poblaciones hospedadoras. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la prevalencia de los tripanosomátidos de abejas en islas, y éstos se han limitado al Pacífico, incluyendo Japón (Morimoto *et al.* 2013; Yamamoto *et al.* 2023), Nueva Zelanda (McFadden *et al.* 2016; Waters 2018; Hall *et al.* 2021) y Hawái (Szalanski *et al.* 2016). Por lo tanto, los estudios realizados en islas de otras latitudes geográficas podrían arrojar luz adicional sobre si estos microorganismos son parásitos recientes o antiguos de las abejas melíferas.

En este sentido, los archipiélagos portugueses de las Azores y Madeira, situados en el océano Atlántico, ofrecen las condiciones ideales ya que en algunas islas existen severas restricciones a la importación de abejas melíferas que fueron impuestas desde el año 2007. Esto hace que el archipiélago de las Azores sea epidemiológicamente único, ya que seis de las nueve islas permanecen libres de *V. destructor*, lo que las convierte en uno de los pocos lugares del mundo libres del ácaro (Comisión Europea, 2021). Además, un estudio reciente reveló la prevalencia de *N. ceranae* en las Azores (Lopes *et al.* 2022) y Madeira (Lopes *et al.* 2023), mostrando que dos islas de las Azores (Flores y Santa María) también han escapado a la propagación mundial del microsporidio *N. ceranae*. Por lo tanto, el archipiélago de las Azores junto con Madeira, que sufrió la invasión de *V. destructor* en el año 2001 (Lopes *et al.*

2023), ofrece un marco incomparable para el estudio de la ecología parasitaria, ya que alberga todo tipo de combinaciones de parásitos.

## 2. OBJETIVOS

Para dar respuesta a estos interrogantes, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Determinar la presencia de tripanosomátidos en las colonias de abejas melíferas de los archipiélagos de Azores y Madeira y establecer la prevalencia de estos utilizando muestras recolectadas de colonias de abejas melíferas durante los años 2014, 2015 y 2020 mediante diversas técnicas moleculares que permiten la detección de *C. mellificae* y *L. passim*, además de otras especies como *C. bombi*, *C. expoeki* y *C. acanthocephali*, menos frecuentes en las abejas melíferas.
- Evaluar si la presencia de *V. destructor* y *N. ceranae* en las colonias de abejas melíferas influye en la prevalencia de tripanosomátidos en las islas.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Recogida de muestras

Este estudio forma parte de otro más amplio realizado entre 2014 y 2015 para describir la prevalencia de patógenos en los archipiélagos de Azores y Madeira. De hecho, las muestras utilizadas en este trabajo son las mismas que se utilizaron para la detección de microsporidios en las islas Azores y Madeira cuyos resultados ya fueron publicados (Lopes *et al.* 2022; 2023). El muestreo se llevó a cabo de acuerdo con el censo apícola oficial disponible para cada isla en el año 2013, con una prevalencia esperada del 15% para diferentes patógenos, una tasa de precisión del 10% y un nivel de confianza del 95%. Se recogieron alrededor de 150 obreras adultas de cada colmena en cada uno de los 159 apiarios georreferenciados de las Azores en el verano de 2014 y 2015, y en 23 apiarios georreferenciados de Madeira en la primavera de 2014 (**Tabla 13**). En la mayoría de los casos, se recogieron muestras de tres colonias al azar, aunque en algunos apiarios se recogieron de dos o cuatro colonias, lo que dio como resultado un total de 483 muestras de las Azores y 89 de Madeira. Además, las islas de Faial, San Jorge, Santa María y Terceira

fueron objeto de un nuevo muestreo en el verano de 2020 (89 colonias de 34 apiarios) (**Tabla 13**). En este último muestreo, cada muestra comprendía entre 20 y 30 obreras. Las muestras de las Azores se enviaron vivas al Centro de Investigación de Montanha (CIMO, Portugal) donde se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se enviaron en hielo seco al Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo (CIAPA, España). Las muestras de Madeira se recogieron en etanol y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su envío al CIAPA. Todas las muestras se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  una vez recibidas en el laboratorio para su posterior análisis.

	2014-2015		2020	
	Apiarios (N)	Colonias (N)	Apiarios (N)	Colonias (N)
Madeira <sup>1, 2</sup>	23	89	-	-
Azores				
Santa María	19	57	12	28
San Miguel <sup>2</sup>	30	105	-	-
San Jorge <sup>2</sup>	17	37	10	30
Faial <sup>1, 2</sup>	20	60	2	8
Pico <sup>1, 2</sup>	25	75	-	-
Graciosa <sup>2</sup>	7	22	-	-
Terceira <sup>2</sup>	26	80	10	23
Flores <sup>1</sup>	15	47	-	-
Total Azores	159	483	34	89

**Tabla 13.** Número de apiarios y colonias muestreados en Madeira y en cada una de las islas del archipiélago de Azores. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.

### 3.2. Procesado de las muestras y extracción del material genético

Para cada colonia muestreada en el periodo de tiempo 2014-2015, se seleccionó una submuestra de 120 obreras. Las abejas se maceraron en tampón AL al 50% (Qiagen®, Hilden, Alemania) como se describe en la **Metodología general** y, posteriormente, obtenido el macerado, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener dos fases, sobrenadante y sedimento, que se procesaron por separado. El sedimento se resuspendió en 3 mL de agua Milli-Q y el ADN se extrajo siguiendo el protocolo de extracción BS + PK descrito en el **Capítulo I**. Solo para las muestras de las Azores recogidas en 2014-2015,

400  $\mu$ L de cada sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos *Deepwell* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se procesaron utilizando el método BS+P descrito en el **Capítulo I**. Como disponíamos de ambas fases (sedimento y sobrenadante) de las muestras de 2014-2015 de las Azores, se utilizaron ambas para determinar cuál era el mejor sustrato para la detección de tripanosomátidos.

Las muestras de abejas recogidas en 2020 de las Azores, se introdujeron en bolsas estériles con 5 mL de agua Milli-Q estéril y se procesaron como se describe en la **Metodología general** y la extracción del ADN se realizó con el método BS+P del **Capítulo I**.

Se incluyeron controles negativos de extracción en todos los pasos de procesamiento y extracción de ADN (uno cada 20 muestras) y se procesaron en paralelo. Todas las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **3.3. Detección molecular de tripanosomátidos**

Para la detección molecular, se utilizó la técnica de PCR convencional utilizando los cebadores Tryp RPB1 descritos previamente (Bartolomé *et al.* 2020) en todas las muestras, tanto en los sedimentos como en los sobrenadantes de las muestras de Azores de 2014-2015, así como en las muestras de 2020 y que se recogen en la **Tabla 14**. Estos cebadores amplifican un fragmento conservado de 283 pb del gen de la ARN polimerasa I (*rpb1*) de todas las especies de tripanosomátidos de la familia Trypanosomatidae que se han detectado en las abejas melíferas hasta la fecha.

Organismo	Cebadores	Secuencia 5' – 3'	Referencias
Trypanosomatidae	Tryp RPB1-F1	GTGGCTGGAYCTGTGGGAGC	Bartolomé <i>et al.</i> (2020)
	Tryp RPB1-R1	GCCRTTGATGAACTTCGCCAC	
<i>C. mellificae</i>	qCmell_Cytb_F	TTTTGCCATGCACTATGATGTCT	
	qCmell_Cytb_R	AACCTATTACAGGCACAGTTGCTAAA	
	qCmell_Cytb_P	6FAM-ATTGAGGATTAACAGTGTTTAGT-BHQ1	
<i>L. passim</i>	qLpass_TOPII_F	GGCCATGGAAATACTCGAGTCT	Buendía-Abad <i>et al.</i> (2023)
	qLpass_TOPII_R	ACCTTGCCCTTCCTTCTTGAGATT	
	qLpass_TOPII_P	6FAM-CCTCGACACGC+T+TA+GT-BHQ1	
<i>C. bombi</i>	qCbom_RPB1_F	TGGTGGGTGCGATTACGAA	
	qCbom_RPB1_R	TCATTGAAGATGACGTGGATAAGC	
	qCbom_RPB1_P	6FAM-CGTTGTTCGGCGCCG-BHQ1	

**Tabla 14.** Cebadores y sondas usadas para la detección de tripanosomátidos por PCR convencional y qPCR. Cebadores: Tryp RPB1 (gen de la *ARN polimerasa I* de la familia Trypanosomatidae); qCmell\_Cytb (gen del *Citocromo b mitocondrial* de *C. mellificae*); qLpass\_TOPII (gen de la *ADN Topoisomerasa II* de *L. passim*) y qCbom\_RPB1 (gen de la subunidad mayor de la *ARN polimerasa II* de *C. bombi*). F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); +: ácidos nucleicos bloqueados (LNAs).

Las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos en un termociclador *MasterCycler® ep gradient S* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µL que contenían 13,25 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL de tampón *5x Phusion™ HF* (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos), 0,5 µL de una solución con mezcla de nucleótidos dNTPs con una concentración 10 mM, 2,5 µL de cada cebador (5 µM), 0,25 µL de enzima *Phusion™ DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos) y 1 µL de ADN muestra. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de desnaturalización de 30 segundos a 98°C, seguido de 45 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 62,2°C y 10 segundos a 72°C, con una extensión final de 8 minutos a 72°C. En todas las reacciones se incluyeron los controles negativos de extracción y de PCR para descartar posibles procesos de contaminación en la PCR, además de un control positivo para comprobar que la PCR se realizó correctamente.

Posteriormente, los fragmentos amplificados se revelaron mediante electroforesis capilar como se describe en la **Metodología general**. En el caso de las muestras de Azores de 2014-2015, como se analizó tanto el sedimento

como el sobrenadante por separado, una muestra se consideró positiva si en al menos una de las fases se registró amplificación.

### 3.4. Secuenciación de Alto Rendimiento

Para realizar este análisis, se seleccionó un subconjunto de 91 muestras que resultaron positivas para el gen *rpb1* en el análisis previo. El producto de PCR de estas muestras se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, Estados Unidos) para determinar la concentración de ADN, y posteriormente se enviaron congeladas al Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la Universidad de Santiago de Compostela (CiMUS) para la preparación de las bibliotecas genéticas y la posterior secuenciación de alto rendimiento (*High-Throughput Sequencing*, HTS).

Para preparar las bibliotecas, a los fragmentos amplificados de cada muestra se les añadieron adaptadores utilizando el producto comercial KAPA HyperPrep (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante desde el paso de reparación de extremos y adición de una adenina en el extremo 3'. Los conjuntos de bibliotecas se normalizaron a una concentración de 4 nM y se cargaron a una concentración de 12 pM en un instrumento Illumina MiSeq para secuenciación de un solo extremo de 1 × 300 pb (Flowcell Nano V2, 2 × 150 pb). Las lecturas generadas en el proceso de secuenciación se demultiplexaron según los códigos de barras asignados a cada muestra y se procesaron en formato *fastp* para eliminar el adaptador y realizar el filtro de calidad. Posteriormente, las lecturas se organizaron en archivos individuales que contenían el número y los haplotipos detectados de cada amplicón en cada muestra, así como el número de lecturas en cada dirección (directa y reversa). Una vez se tuvieron los archivos individuales, se convirtieron a formato *fasta* para la alineación de secuencias con el programa informático MACSE v2.05 (*Multiple Alignment of Coding SEquences*), que alineó el conjunto de datos de genes codificadores de proteínas sin alterar la estructura de codones subyacente (Ranwez *et al.* 2011). Las secuencias de referencia del gen *rpb1* se obtuvieron de la base de datos *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information NCBI*) para las especies *L. passim* (MT558272.1 y LT976801), *C. mellifica* (MT558227.1 y MT558204.1), *C. bombi* (MT558162.1 y MT558134.1), *C. acanthocephali* (MW28878781.1) y un nuevo

taxón descrito recientemente *Trypanosomatidae* sp. (MN038411.1) (Bartolomé *et al.* 2020). Las secuencias se visualizaron con el programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999) y, aquellas que tuvieran inserciones o eliminaciones de nucleótidos (*indels*) o codones de parada se eliminaron del conjunto de datos final.

### 3.5. Detección de las especies de tripanosomátidos

En este caso, todas las muestras que resultaron positivas en el análisis de PCR con los cebadores genéricos y que no fueron secuenciadas mediante HTS se analizaron mediante la técnica de qPCR en tres reacciones independientes para la detección específica de *L. passim*, *C. mellificae* y *C. bombi* utilizando los cebadores descritos previamente (Buendía-Abad, Martín-Hernández y Higes 2023) y que se muestran en la **Tabla 14**.

Se analizaron tanto las muestras de Madeira, los sedimentos y los sobrenadantes de las muestras de Azores del período 2014-2015, y las muestras de Azores de 2020 sin separación de fases. De nuevo, se analizaron en paralelo controles negativos y positivos en todas las reacciones. Al igual que en la PCR convencional, una muestra que fuera positiva en al menos una de las dos fases de las muestras de Azores 2014-2015 se consideró positiva. Además, los amplicones de las muestras que dieron un resultado negativo por la qPCR específica pero positivo por la amplificación PCR estándar con los cebadores Tryp RPB1 se purificaron con el kit *QIAquick* (Qiagen®, Hilden, Alemania) y se secuenciaron mediante la técnica de Sanger en ambas direcciones en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (España) en un analizador genético 3730 (Applied Biosystems Life Technologies Corp., Foster City, CA, Estados Unidos). Las secuencias resultantes se analizaron manualmente con el programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall 1999) y comparadas con las secuencias de referencia de la base de datos *Genbank*.

En cuanto a la distribución geográfica de las colonias en cada isla, se representó con el programa informático *ArcGIS* (ESRI, 2011).

### 3.6. Análisis estadísticos

La sensibilidad de la detección de tripanosomátidos en el sedimento y en el sobrenadante se comparó utilizando la prueba de chi-cuadrado con

corrección de Yates. Para determinar si la presencia de *V. destructor* o *N. ceranae* influyó en la prevalencia de *L. passim* en cada isla analizada, se realizaron modelos lineales generalizados (*Generalised Linear Models, GLM*) con una familia binomial y una función de enlace logit incluyendo el factor isla como covariable con el paquete *stat* de *R Studio* (versión 4.3.2). Este último análisis únicamente se realizó con los datos de las muestras de Azores recogidas en los años 2014-2015 ya que los muestreos se realizaron y analizaron de forma homogénea.

Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comparación entre sedimento y sobrenadante

Para determinar la mejor fase para la detección de tripanosomátidos, se realizó el análisis del sedimento y del sobrenadante de 477 muestras de Azores recogidas entre los años 2014 y 2015 (**Tabla 15**, 6 muestras quedaron fuera de este análisis porque no había suficiente sobrenadante para ser analizado). El sobrenadante registró mayor número de muestras positivas (55,34%) que el sedimento (50,73%), aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambas fases ( $X^2=2.04$ ,  $gl=1$ ;  $p=0.15$ ).

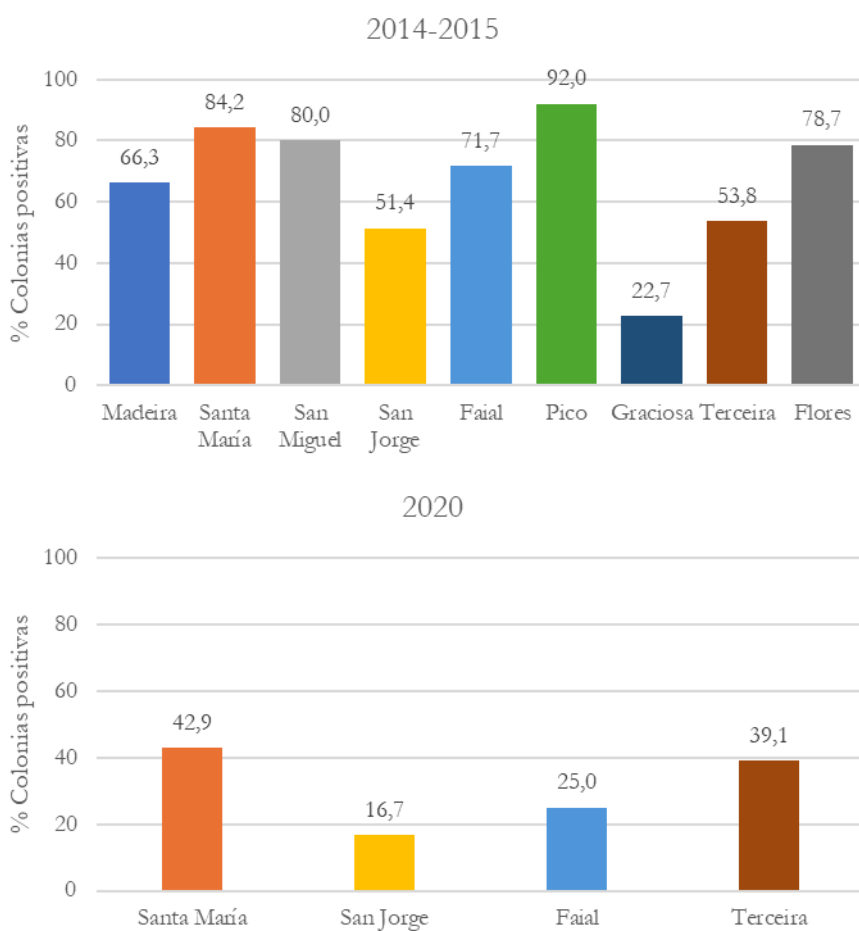
	Sobrenadante (+)	Sobrenadante (-)	Total
Sedimento (+)	161 (33.75%)	81 (16.98%)	242 (50.73%)
Sedimento (-)	103 (21.59%)	132 (27.67%)	235 (49.27%)
<b>Total</b>	<b>264 (55.34%)</b>	<b>213 (44.65%)</b>	<b>477 (100%)</b>

**Tabla 15.** Número y porcentaje de positivos a tripanosomátidos (+) y negativos (-) en el sedimento y sobrenadante obtenidos de los macerados de abejas de las muestras de Azores 2014-2015.

### 4.2. Prevalencia de tripanosomátidos

La prevalencia de tripanosomátidos se muestra en la **Figura 21**. Debido a que las muestras de Madeira, Azores 2014-2015 y Azores 2020 se procesaron de forma diferente, no se realizaron comparaciones entre estos tres grupos.

En Madeira, la prevalencia de tripanosomátidos fue del 66,3%, mientras que en las Azores fue del 72% en el período de tiempo 2014-2015, con el mayor número de colonias positivas detectadas en Pico (92%) y el menor en Graciosa (22,7%). En el último muestreo (2020), el 31,5% de las colonias analizadas fueron positivas, siendo la isla de Santa María la que registró el mayor porcentaje de positivos (42,9%) y el menor la isla de San Jorge (16,7%).



**Figura 21.** Prevalencia (%) de Trypanosomatidae en cada una de las islas analizadas en el período 2014-2015 y 2020.

### 4.3. Identificación de especies

#### 4.3.1. Secuenciación de Alto Rendimiento

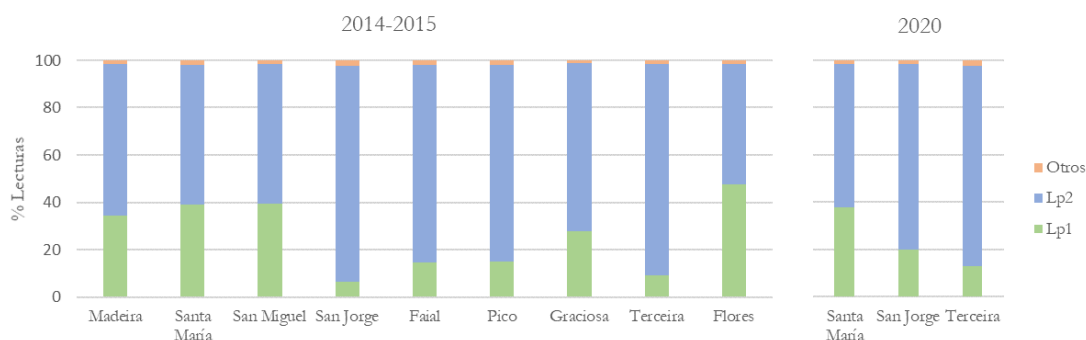
En el proceso de secuenciación de las 91 muestras secuenciadas se obtuvieron 1.385.021 lecturas brutas que, tras el filtrado, dieron lugar a 1.208.665 secuencias de tripanosomátidos, lo que representa una media de 13.282 secuencias por muestra. La identificación de todas las secuencias reveló que *L. passim* era la única especie presente en el conjunto de datos. Se encontraron dos haplotipos principales de esta especie en todas las muestras y en todas las islas y que coincidían con las secuencias de referencia MT558272.1 y LT976801.1 (en lo sucesivo denominadas Lp1 y Lp2, respectivamente) de la base de datos *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Estos dos haplotipos diferían en un solo nucleótido en la posición 29 del amplicón, con Lp1 con una timina (T) y el Lp2 con una citosina (C) (**Figura 22**).



**Figura 22.** Variación de un nucleótido (T/C) en la secuencia del gen *rpb1* entre los dos haplotipos mayoritarios de *L. passim* en la posición 29. Las marcas y la numeración indican la posición en la secuencia en pares de bases. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

En total, estos dos haplotipos representaron aproximadamente el 98% de las secuencias encontradas (Figura 3). De media, el 72,9% de las lecturas obtenidas de todas las islas se correspondían con el haplotipo Lp2, mientras que el 25,3% se correspondían con el haplotipo Lp1. Esta diferencia fue más notable en las muestras recogidas en Madeira y en las islas centrales del archipiélago de Azores en el período 2014-2015, donde más del 70% de las secuencias correspondieron al haplotipo Lp2 (**Figura 23**). Sin embargo, estos dos haplotipos no se distribuían dentro de cada isla con algún patrón geográfico definido. El 2% de las secuencias restantes se encontraron a una frecuencia muy baja y parecían ser variantes de los dos haplotipos mayoritarios, con cambios adicionales de un solo nucleótido y que no coincidían con ninguna secuencia disponible en *GenBank*. Todas las secuencias de los haplotipos encontrados (tanto Lp1 como Lp2 y los de baja frecuencia) se

depositaron en la base de datos *GenBank* (números de acceso OR117383 a OR117469).



**Figura 23.** Proporción de los dos haplotipos principales de *L. passim* (Lp1 y Lp2) y de las variantes de estos (Otros) detectados en cada isla.

#### 4.3.2. Confirmación de especies por qPCR

El resto de las muestras positivas que no se analizaron por HTS (n=344), se analizaron por qPCR utilizando los cebadores específicos para detectar la presencia de *L. passim*, *C. mellificae* y *C. bombi* (**Tabla 14**). De las 344 muestras analizadas, al menos una de estas especies se detectó excepto en 3 de ellas (una de Madeira, una de Santa María y otra de San Miguel), las cuales no registraron amplificación para ninguna de las tres especies. Por lo tanto, el producto de PCR obtenido con los cebadores Tryp RPB1 en estas muestras se secuenció mediante la técnica de Sanger.

Los resultados confirmaron que *L. passim* era la especie predominante en Madeira y en las Azores, aunque no la única, ya que también se detectó *C. bombi* en algunas las islas de Flores, Faial y San Miguel (**Tabla 16**). En el primer período de muestreo (2014-2015), se identificó como la única especie a *L. passim* en el 64,2% de las colonias positivas de Madeira, mientras que *C. bombi* se encontró en el 34% aunque siempre junto a *L. passim* (**Tabla 16**). En las islas de San Jorge, Pico, Graciosa, Santa María y Terceira, *L. passim* fue la única especie detectada, mientras que, en Flores, *C. bombi* fue la única especie detectada en una sola colonia (3,7%). Sin embargo, en San Miguel y Faial, esta especie siempre se encontró asociada a la presencia de *L. passim*. En las muestras recogidas en 2020, únicamente se detectó *L. passim* (**Tabla 16**).

Finalmente, *C. mellificae* no se encontró en ninguna de las muestras analizadas a lo largo de este estudio.

2014-2015	N	<i>L. passim</i>	<i>C. mellificae</i>	<i>C. bombi</i>	<i>L. passim</i> y <i>C. bombi</i>
Madeira	53	64,2	ND	ND	34
Azores					
Santa María	38	97,4	ND	ND	ND
San Miguel <sup>2</sup>	74	95,9	ND	ND	2,7
San Jorge <sup>2</sup>	12	100	ND	ND	ND
Faial <sup>1, 2</sup>	33	97	ND	ND	3
Pico <sup>1, 2</sup>	59	100	ND	ND	ND
Graciosa <sup>2</sup>	1	100	ND	ND	ND
Terceira <sup>2</sup>	34	100	ND	ND	ND
Flores <sup>1</sup>	27	96,3	ND	3,7	ND
Total Azores	278	97,8	ND	0,4	1,1
2020					
Santa María	7	100	ND	ND	ND
Faial <sup>1, 2</sup>	2	100	ND	ND	ND
Terceira <sup>2</sup>	4	100	ND	ND	ND
Total Azores	13	100	ND	ND	ND

**Tabla 16.** Porcentaje de cada especie de tripanosomátido detectada por qPCR en las muestras positivas. ND: no detectado. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.

La secuenciación por Sanger de los amplicones del cebador Tryp RPB1 de las tres muestras negativas tras la qPCR mostró una homología del 100% con la secuencia MT558162.1 de *C. bombi* en la muestra de Madeira, en la muestra de Santa María la secuencia era idéntica al haplotipo Lp2 de *L. passim*, mientras que en la muestra de San Miguel se distinguieron fácilmente dos picos para C/T en la posición 29 del amplicón, correspondientes a los haplotipos Lp1 y Lp2 de *L. passim*.

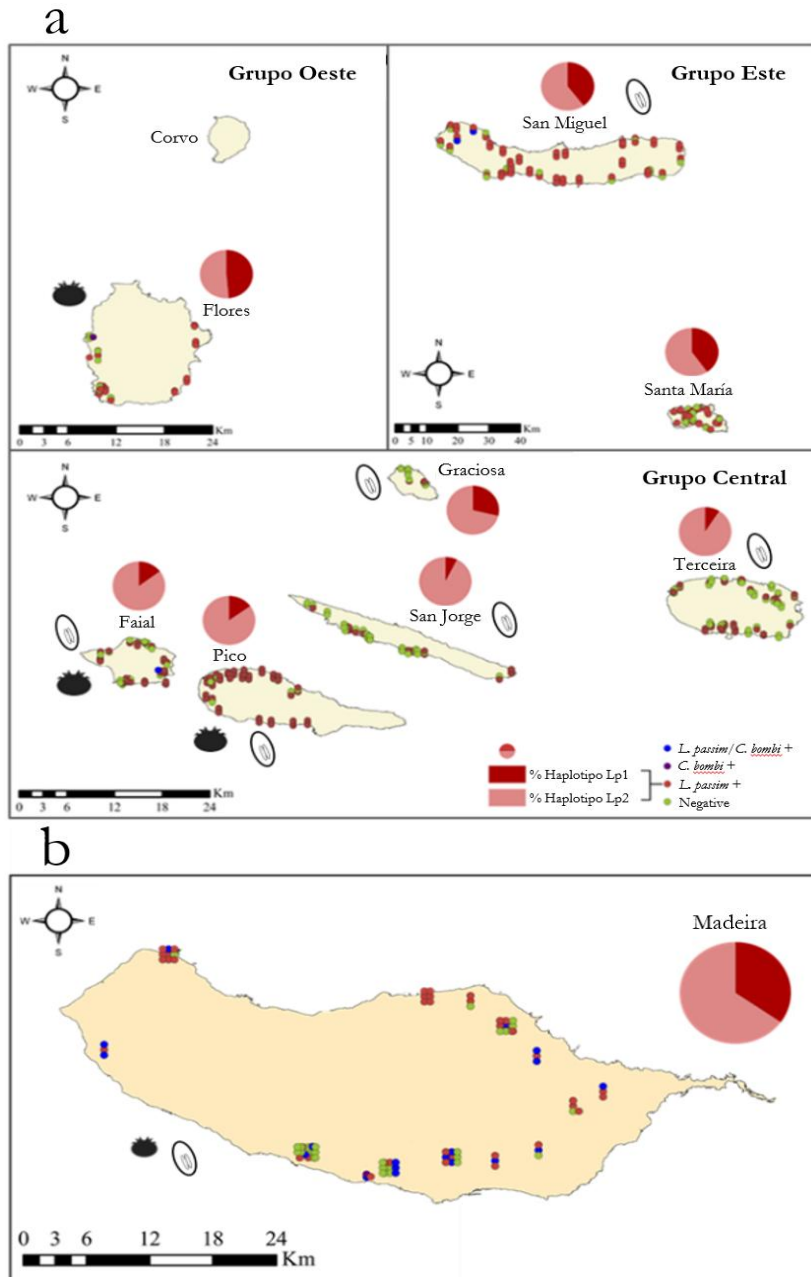
#### 4.4. Prevalencia total de especies de tripanosomátidos en Madeira y las Azores

La prevalencia total de cada especie de tripanosomátido se calculó recopilando todos los resultados obtenidos de las diferentes técnicas utilizadas

(HTS, qPCR y secuenciación de Sanger) (**Tabla 17, Figura 24**). En Madeira, el número de colonias en las que se detectaron tripanosomátidos fue del 66,3%, con *L. passim* siendo la única especie detectada en el 44,9%, *C. bombi* en el 1,1% y ambas especies juntas en el 20,2% de las colonias analizadas. En las muestras de Azores del período 2014-2015, 348 colonias fueron positivas a tripanosomátidos (72%). La especie *L. passim* se encontró en todas las islas y fue la única especie detectada en el 71,2% de las muestras. Sin embargo, *C. bombi* se encontró raramente en las islas Azores, siendo la única especie detectada en una colonia de Flores (representando el 0,2% en el archipiélago) y se dio simultáneamente con *L. passim* en San Miguel y Faial (0,6%). En las muestras de 2020, todas las colonias que fueron positivas a tripanosomátidos (31,5%) también lo fueron a *L. passim*, y fue la única especie detectada en este período de muestreo (**Tabla 17**).

2014-2015	Trypanosomatidae	<i>L. passim</i>	<i>C. mellificae</i>	<i>C. bombi</i>	<i>L. passim</i> y <i>C. bombi</i>
Madeira	<b>66,3</b>	<b>44,9</b>	ND	<b>1,1</b>	<b>20,2</b>
Azores					
Santa María	84,2	84,2	ND	ND	ND
San Miguel <sup>2</sup>	80,0	78,1	ND	ND	1,9
San Jorge <sup>2</sup>	51,4	51,4	ND	ND	ND
Faial <sup>1,2</sup>	71,7	70,0	ND	ND	1,7
Pico <sup>1,2</sup>	92,0	92,0	ND	ND	ND
Graciosa <sup>2</sup>	22,7	22,7	ND	ND	ND
Terceira <sup>2</sup>	53,8	53,8	ND	ND	ND
Flores <sup>1</sup>	78,7	76,6	ND	2,1	ND
Total Azores	<b>72,0</b>	<b>71,2</b>	<b>ND</b>	<b>0,2</b>	<b>0,6</b>
<b>2020</b>					
Santa María	42,9	42,9	ND	ND	ND
San Jorge <sup>2</sup>	16,7	16,7	ND	ND	ND
Faial <sup>1,2</sup>	25,0	25,0	ND	ND	ND
Terceira <sup>2</sup>	39,1	39,1	ND	ND	ND
Total Azores	<b>31,5</b>	<b>31,5</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

**Tabla 17.** Prevalencia de cada especie de tripanosomátido (%) detectada sola o simultáneamente en cada isla agrupando los datos de todas las técnicas utilizadas (PCR convencional, HTS, qPCR y secuenciación de Sanger). ND: no detectado. <sup>1</sup>Islas con *V. destructor*; <sup>2</sup>Islas con *N. ceranae*.



**Figura 24.** Distribución geográfica de *C. bombi* y *L. passim* (con sus haplotipos) en el archipiélago de las Azores (a) y Madeira (b). ● Islas con presencia de *V. destructor*. ○ Islas con presencia de *N. ceranae*. El color rojo en los gráficos de sectores indica el porcentaje de secuencias que coinciden con el haplotipo Lp1, mientras que el color rosa indica el porcentaje de secuencias que coinciden con el haplotipo Lp2 ● *C. bombi* + *L. passim*; ● *C. bombi*; ● *L. passim*; ● Colonia negativa.

Dado que *L. passim* fue la especie detectada con mayor prevalencia y distribución en el estudio, se analizó la influencia de *V. destructor* y *N. ceranae* en su presencia únicamente en las muestras de Azores del período 2014-2015. Así, la prevalencia de *L. passim* fue significativamente más alta en las islas con *V. destructor* (coeficiente de regresión=0,77; valor  $z=3,41$ ;  $p<0,01$ ; **Tabla 18**) que en aquellas sin el ácaro. En contraste, en las islas donde *N. ceranae* está presente, la prevalencia de *L. passim* fue menor (coeficiente de regresión=-0,56; valor  $z=-2,03$ ;  $p<0,01$ ; **Tabla 18**). Sin embargo, al incluir el factor isla como covariable, el efecto de *N. ceranae* en la presencia de *L. passim* se diluyó, no mostrando diferencias significativas (coeficiente de regresión=-0,29; valor  $z=-0,66$ ;  $p=0,51$ ) mientras que se mantuvo la significancia para *V. destructor* (coeficiente de regresión=1,06; valor  $z=2,15$ ;  $p=0,03$ ).

	<i>L. passim</i> (+)	<i>L. passim</i> (-)	Total
<i>V. destructor</i> (+)	148 (81,32%)	34 (18,68%)	182 (100%)
<i>V. destructor</i> (-)	199 (66,11%)	102 (33,89%)	301 (100%)
<i>N. ceranae</i> (+)	263 (69,39%)	116 (30,61%)	379 (100%)
<i>N. ceranae</i> (-)	84 (80,77%)	20 (19,23%)	104 (100%)

**Tabla 18.** Número (y porcentaje) de muestras positivas (+) y negativas (-) a *L. passim* recogidas en 2014-2015 en las Azores en función de si *V. destructor* o *N. ceranae* estaban presentes (+) o no (-).

## 5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la prevalencia de las especies de tripanosomátidos en las colonias de abejas melíferas de Madeira y las Azores, y determinar si la presencia de *V. destructor* y *N. ceranae* en algunas islas influía en su distribución.

Los datos obtenidos en este estudio revelan que *L. passim* es la principal especie de tripanosomátido encontrada y la única identificada en la mayoría de las colonias analizadas. Resulta relevante que *C. mellificae*, la especie descrita previamente como parásito de las abejas melíferas hasta la identificación de *L. passim* (Cepero *et al.* 2014; Schwarz *et al.* 2015), no está presente en los territorios analizados o se encuentra por debajo de nuestro límite de detección. Tampoco se identificaron ni *C. acanthocephali* ni *C. expoeki*, aunque su detección

sólo habría sido posible en las 91 muestras analizadas mediante HTS, lo que representa un porcentaje bajo del total de las muestras del estudio.

Este escenario en el que *L. passim* es la principal especie de tripanosomátido en colonias de abejas melíferas parece repetirse en todo el mundo (Arismendi *et al.* 2016; Stevanovic *et al.* 2016; Castelli *et al.* 2019; Vejnovic *et al.* 2018; Bordin *et al.* 2022; Mráz *et al.* 2021; Xu *et al.* 2018; Williams, Tripodi y Szalanski 2019; Buendía-Abad, Martín-Hernández y Higes 2023). Dada la alta prevalencia encontrada aquí y en otros lugares, es probable que *L. passim*, y no *C. mellificae*, fuera la principal especie que infectaba a las abejas melíferas en los estudios realizados antes de su descripción (Ravoet *et al.* 2013; Morimoto *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013; Cepero *et al.* 2014). De hecho, la frecuencia observada y la ausencia de *C. mellificae* en muchas zonas del mundo corroboran la hipótesis de que *L. passim* es un parásito común de *Apis mellifera* y que actualmente es la especie de tripanosomátido dominante en las colonias de abejas (Schwarz *et al.* 2015; Arismendi *et al.* 2016; Williams, Tripodi y Szalanski 2019; Buendía-Abad, Martín-Hernández y Higes 2023). Por otra parte, *C. bombi* se identificó en tres islas y casi siempre simultáneamente con *L. passim*, aunque solo en algunas colonias. Estos resultados confirman hallazgos anteriores (Bartolomé *et al.* 2018; 2020; Ocepek *et al.* 2021), en los que se confirma que *C. bombi* se encuentra también en las colonias de *Apis mellifera*.

Una cuestión que queda por resolver es cómo entraron los tripanosomátidos en las Azores ya que este archipiélago se encuentra aislado en el océano Atlántico muy lejano del continente, por lo que la llegada natural de abejas no es posible, así que la opción más probable es que se tratara de una introducción de origen humano. Sería sencillo pensar que Pico fue el punto de entrada, ya que es la isla que alberga el mayor número de colonias positivas para tripanosomátidos y también fue el punto de entrada de *V. destructor* en las Azores y muy probablemente de *N. ceranae* (Lopes *et al.* 2022). Sin embargo, la detección de *L. passim* en una gran proporción de colonias en Santa María, isla en la que no está presente ni el ácaro ni el microsporidio, no apoyan esta hipótesis. La amplia distribución de *L. passim* en las islas Azores que permanecen libres de *V. destructor* sugiere claramente que esta especie ha estado asociada a *A. mellifera* desde antes de la propagación mundial del ácaro. Un escenario similar se encontró en el archipiélago de Hawái, en el que alguna de

sus islas aún se encuentra libres del ácaro y en las que también se ha detectado *L. passim* (Szalanski *et al.* 2016). Igualmente, en Nueva Zelanda, libre de *Varroa* hasta el año 2000, se observó un aumento significativo de pérdida de colonias en el año 2014 y el análisis de estas reveló que la mayoría se encontraban parasitadas con *L. passim* (McFadden *et al.* 2016; Waters 2018; Hall *et al.* 2021). En cuanto a la presencia de *C. bombi* en las colonias de abejas melíferas, esta podría explicarse por la coexistencia con abejorros en Madeira (Widmer *et al.* 1998) y en las Azores (Prýs-Jones, Williams y Carolan 2018) debido al uso común de los recursos florales (Adler *et al.* 2018; Strobl *et al.* 2019; Arismendi *et al.* 2022), ya que esta especie es más común en abejorros.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que las islas con el ácaro tuvieron una prevalencia significativamente mayor de *L. passim*. Otros estudios han reportado una asociación entre ellos (Castelli *et al.* 2019), detectando incluso ADN de este tripanosomátido en los ácaros, cuya importancia biológica es aún incierta (Quintana *et al.* 2021). Por el contrario, cuando se incluyó la isla como covariable, no se observó ningún efecto de *N. ceranae* sobre la prevalencia de *L. passim*, como ya habían señalado anteriormente otros autores (Stevanovic *et al.* 2016; Buendía *et al.* 2018). Sin embargo, sí que se ha descrito una asociación positiva entre los niveles de infección en colonias con *N. ceranae* y *L. passim* (Vejnovic *et al.* 2018). A pesar de las diferencias relacionadas con la presencia de *V. destructor* y *N. ceranae*, está claro que los tripanosomátidos están bien establecidos en las Azores y Madeira, de modo que las fuertes restricciones impuestas a la introducción de abejas melíferas en las islas de las Azores libres de *Varroa* no han impedido la presencia de tripanosomátidos.

En cuanto a las técnicas empleadas en este estudio, además de corroborar que tanto el sedimento como el sobrenadante obtenidos del macerado de las abejas son válidos para la detección de tripanosomátidos, el uso de diferentes tecnologías fue clave para identificar todas las especies presentes en la zona de la Macaronesia. De este modo, por un lado, la técnica HTS permitió detectar diferentes haplotipos presentes, pero no todas las especies, dado que el coste de esta técnica limitó el número de muestras a analizar. Por otro lado, la técnica de qPCR sirvió para complementar el estudio analizando el resto de las muestras previamente positivas a tripanosomátidos, que sirvió además para identificar a *C. bombi* a baja prevalencia.

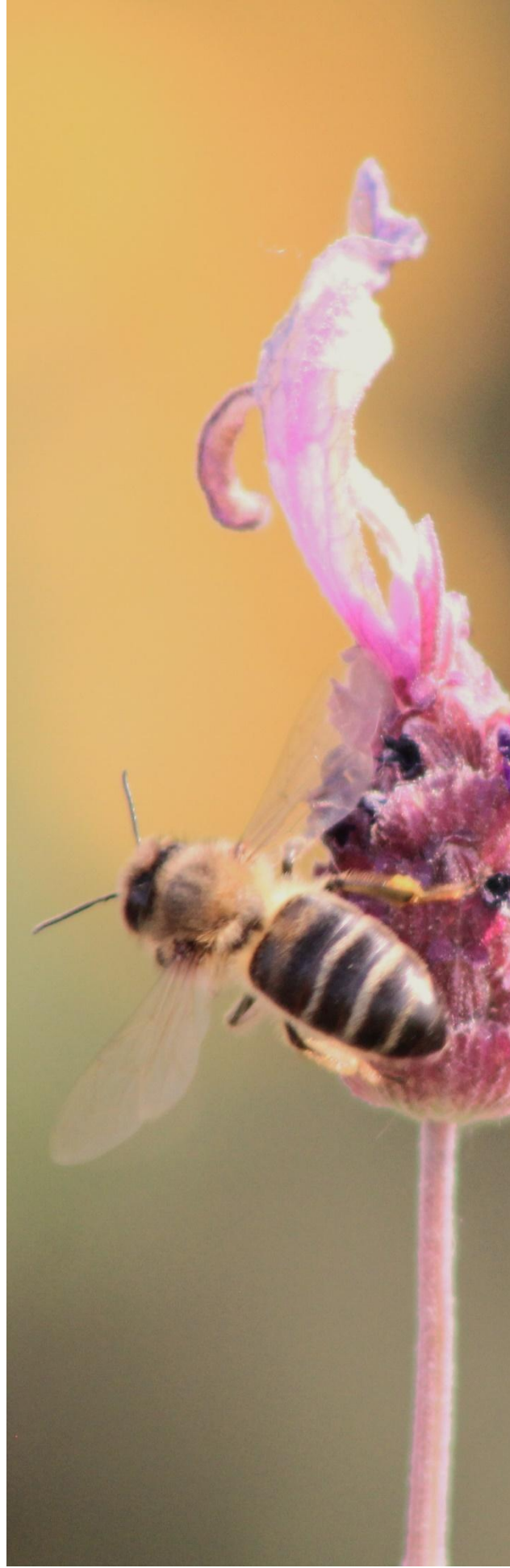
Existen pocos datos disponibles en lo referido al gen *rpb1* en genética de poblaciones de tripanosomátidos que infectan a las abejas melíferas o a los abejorros. Sin embargo, recientemente se ha analizado este gen observando polimorfismos genéticos entre las especies *C. melliferae*, *C. bombi* y *L. passim* (Bartolomé *et al.* 2020; 2021; 2022). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos para el gen *rpb1* de *L. passim*, indicando que había dos haplotipos principales que sólo diferían en un nucleótido. No se puede descartar que las secuencias encontradas a baja frecuencia correspondan a verdaderos haplotipos, aunque sería necesaria una confirmación experimental adicional. Otros genes como el *ARNr 18S*, el *ARNr 28S* y el *its-2* han sido estudiados para evaluar la variación intraespecífica, y sus secuencias eran casi idénticas entre las diferentes cepas de *L. passim*, con la excepción del factor de virulencia *gp63*, que parece tener un tramo variable entre cepas (Ravoet *et al.* 2015). Por lo tanto, es posible que el gen *rpb1* no tenga suficiente variación para distinguir las cepas, pero esto también puede ocurrir en otros genes.

En este trabajo se ha demostrado que los tripanosomátidos característicos de las abejas melíferas se encuentran en zonas geográficamente aisladas como Madeira y el archipiélago de las Azores, y además a frecuencias elevadas, incluso cuando existen restricciones a los movimientos de colonias de abejas hacia islas libres del ácaro *V. destructor*. La especie predominante es *L. passim*, apareciendo como única especie en muchas colonias y mostrando una mayor prevalencia en islas con *V. destructor* y una menor prevalencia en islas con *N. ceranae*. Además, *C. bombi* también está presente, a menudo junto con *L. passim*. La detección de *L. passim* y *C. bombi* en zonas donde *V. destructor* y *N. ceranae* no están presentes sugiere que han estado asociadas a *A. mellifera* durante mucho más tiempo de lo que se pensaba en un principio.



## CAPÍTULO III

Influencia de *Varroa destructor*,  
*Nosema ceranae* y *Lotmaria*  
*passim* en la microbiota intestinal  
de las abejas





## Influencia de *Varroa destructor*, *Nosema ceranae* y *Lotmaria passim* en la microbiota intestinal de las abejas

Artículo en preparación

Las restricciones de movimientos de colonias de abejas en las islas Azores han limitado la propagación de patógenos como *V. destructor* (V) y *N. ceranae* (N) por el archipiélago, de modo que hay islas con diferentes combinaciones de estos patógenos, es decir, positivas o negativas a *V. destructor* y/o a *N. ceranae* a pesar de ser los patógenos más frecuentes en todo el mundo. En este trabajo, estudiamos la microbiota intestinal de abejas pertenecientes a 4 islas con diferente distribución de patógenos para determinar si la presencia de alguno de ellos influye en la microbiota intestinal de las abejas. Para ello, se analizaron abejas de 15 colonias de Pico (V+, N+), Flores (V+, N-), Terceira (V-, N+) y Santa María (V-, N-) que se procesaron colectivamente. Además, se analizaron 18 abejas jóvenes de esta última isla, que se procesaron de forma individual. Adicionalmente se incluyó la presencia *L. passim* en el estudio, y puesto que este parásito se encuentra en todas las islas, se comparó entre colonias con y sin el parásito. En todas las muestras se secuenció el gen *ARNr 16S* bacteriano completo mediante secuenciación *PacBio Sequel II/III*. Los resultados mostraron que los taxones bacterianos característicos del intestino de las abejas melíferas se encuentran conservados en todas las islas independientemente de la presencia o ausencia de patógenos, siendo *Lactobacillus*, *Bartonella*, *Bifidobacterium* y *Snodgrassella* los más abundantes. Las abejas jóvenes de Santa María mostraron una diversidad menor de bacterias con *Lactobacillus*, *Bombilactobacillus* y *Staphylococcus* como los géneros mayoritarios. Curiosamente, las abejas de Terceira (V-, N+) mostraron un perfil bacteriano diferente al resto de islas, con una abundancia relativa mayor en casi todos los géneros bacterianos a excepción de *Bartonella*. La presencia de *V. destructor* a nivel insular influyó en la abundancia de *Bartonella*, *Snodgrassella*, *Apilactobacillus* y *Gilliamella*; mientras que la presencia de *N. ceranae* influyó en la abundancia de *Bartonella* y *Lactobacillus*. La presencia de *N. ceranae* también se analizó a nivel de colmena en aquellas en las que el microsporidio estaba presente y, en este caso, las colmenas con *N. ceranae* presentaron mayor abundancia de *Gilliamella* y *Frischella*. Las colmenas con *L. passim* mostraron una menor abundancia relativa de *Frischella*, *Gilliamella* y *Snodgrassella*. Estos resultados proporcionan una primera caracterización de la microbiota intestinal de las abejas en zonas libres de *V. destructor* y *N. ceranae*, y muestran como estos parásitos junto con *L. passim*, pueden haber influido en la microbiota intestinal de las abejas melíferas.

## 1. INTRODUCCIÓN

El archipiélago de las Azores consta de nueve islas con poblaciones endémicas de abejas pertenecientes al linaje africano, aunque también existen pruebas genéticas de la introducción de abejas europeas (Ferreira *et al.* 2020). Estas introducciones muy probablemente facilitaron la entrada en algunas islas de dos de los patógenos más prevalentes a nivel mundial como *V. destructor* y *N. ceranae* (Ferreira *et al.* 2020; Lopes *et al.* 2022), quedando muy pocas regiones en el mundo que han logrado mantenerse libres de ellos. Sin embargo, gracias a las restricciones de movimientos de colonias de abejas en algunas islas de las Azores, la propagación de estos patógenos por el archipiélago se ha limitado. Como resultado, algunas de ellas se mantienen libres de *V. destructor* y/o *N. ceranae*, por lo que hay islas con diferentes combinaciones de patógenos. En particular, la isla de Santa María ha logrado mantenerse libre de la colonización de ambos, ofreciendo uno de los escenarios únicos en el mundo para el estudio de las abejas y observar cómo eran antes de la acción patógena de *V. destructor* y *N. ceranae*.

Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha que abordan el estudio de la microbiota intestinal de las abejas se han realizado en áreas donde estos patógenos ya están presentes, por lo que la microbiota intestinal de las abejas ya ha podido ser influenciada por ellos. Por tanto, las abejas de las islas Azores ofrecen una oportunidad única para entender cómo la microbiota intestinal era antes de la colonización por estos patógenos y determinar si su presencia la ha modificado. Por otro lado, el hecho de disponer de islas con una combinación diferente de patógenos permite analizar la influencia de cada uno de ellos en las bacterias intestinales.

Además, a pesar de que *L. passim* se encuentra distribuida en todas las islas del archipiélago (ver **Capítulo II**), son muy pocos los estudios que exploran su impacto en la microbiota intestinal. Por tanto, determinar su influencia en las comunidades bacterianas intestinales puede servir de base para establecer el efecto del parásito en la microbiota intestinal de las abejas.

## 2. OBJETIVOS

Dada la situación epidemiológica de algunas islas del archipiélago de Azores, se estableció como objetivo caracterizar la microbiota intestinal de las

abejas con distinta combinación de parásitos para determinar la influencia de *V. destructor*, *N. ceranae* y *L. passim* en las bacterias intestinales.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Selección de muestras

Las muestras utilizadas en este estudio corresponden a un subgrupo de las utilizadas en el **Capítulo II**. En este caso, se seleccionaron las islas de Pico, Flores, Santa María y Terceira, islas que presentaban diferentes combinaciones en cuanto a la coexistencia de *V. destructor* y/o *N. ceranae* (Lopes *et al.* 2022), mientras que *L. passim* se encontraba en todas las islas (ver **Capítulo II**) (**Tabla 19**). Para la detección de *N. ceranae* se utilizó la técnica de PCR descrita por Martín-Hernández *et al.* (2012) (ver **Metodología general**), mientras que la presencia de *V. destructor* en la isla se consideró el comunicado de la Comisión Europea que certifica el estatus de zona libre del ácaro (Comisión Europea, 2021). De cada isla, se seleccionaron de forma aleatoria 15 colmenas de las que se tomaron una muestra de 15 abejas obreras que se procesaron de forma conjunta por cada colmena. Las abejas utilizadas se encontraban conservadas a -80°C en el laboratorio de patología del CIAPA de Marchamalo.

Isla	Presencia de <i>N. ceranae</i>	Presencia de <i>V. destructor</i>	Presencia de <i>L. passim</i>
Pico	+	+	+
Flores	-	+	+
Terceira	+	-	+
Santa María	-	-	+

**Tabla 19.** Presencia de patógenos en cada una de las islas analizadas en este estudio.

Adicionalmente, se recogieron 18 abejas de la cámara de cría de una colmena de la isla de Santa María en marzo de 2022, con el fin de recoger abejas jóvenes, que son las que se encuentran principalmente en esta localización. Las abejas se transportaron vivas al laboratorio y allí se anestesiaron en frío y se procesaron individualmente en condiciones de esterilidad, utilizando un mechero Bunsen para mantener un ambiente libre de contaminantes. Todo el material utilizado fue previamente esterilizado y se desinfectaron las superficies de trabajo con etanol para minimizar el riesgo de

contaminación. El intestino de cada abeja se extrajo cuidadosamente tirando del último segmento del abdomen utilizando pinzas estériles. Cada intestino se depositó en un tubo estéril (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) que contenían 5 mL de solución salina estéril. Los tubos se transportaron en refrigeración al Laboratorio de Patología Apícola del CIAPA de Marchamalo para su procesamiento y extracción del material genético para su posterior estudio metataxonómico.

### 3.2. Extracción de ADN

Una vez en el laboratorio del CIAPA, todas las muestras (las del primer muestreo y las de Santa María recogidas en 2022) se procesaron en una campana de flujo laminar (Telstar AV-30/70).

Las abejas seleccionadas del banco de muestras se lavaron con etanol y, posteriormente, con agua Milli-Q estéril para eliminar las bacterias que pudieran tener en su superficie. Seguidamente, las 15 abejas de cada colmena se introdujeron en una bolsa estéril con filtro con 2,5 mL de agua calidad PCR (Qiagen®, Hilden, Alemania) y se procesaron como se describe en la **Metodología general**. En este caso, las muestras se dispusieron en placas de 96 pocillos que, además de las 5 perlas de vidrio, también contenía *FastPrep Fp120* (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) y 120  $\mu$ L de tampón ATL (Qiagen®, Hilden, Alemania) para facilitar la lisis de las células.

Por otro lado, el intestino de cada abeja del muestreo de Santa María de 2022 se procesó de forma individual. Cada tubo que contenía el intestino de cada abeja se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Se eliminó todo el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500  $\mu$ L de agua calidad PCR. De este macerado, se cogieron 300  $\mu$ L que se dispensaron en una placa de 96 pocillos en las mismas condiciones que se han mencionado en el párrafo anterior.

Todas las muestras se agitaron en un *TissueLyser* (Qiagen®, Hilden, Alemania) durante 90 segundos a 30 Hz. Posteriormente, de cada muestra se cogieron 150  $\mu$ L y se transfirieron a una placa *Deepwell* de 96 pocillos (*Bio.Sprint 96 DNA Blood kit*, 940057, Qiagen®, Hilden, Alemania) con ribonucleasa A (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 15 min para eliminar el ARN. Una vez terminada la incubación, se añadieron 20  $\mu$ L de proteinasa K y se

incubaron a 56°C durante 1 hora. Por último, se llevó a cabo la extracción del ADN mediante el robot automático *BioSprint* tal y como se describe en el **Capítulo I**.

En todos los casos se añadieron controles negativos de extracción (uno cada 20 muestras) que se procesaron en paralelo como se ha descrito. Finalizada la extracción, la concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Posteriormente, los extractos de ADN se congelaron a -20 °C hasta su posterior envío a la empresa Novogene Co. (Beijing, China) para realizar el análisis metataxonómico.

El envío de muestras se realizó en dos periodos de tiempo. En un primer lote de muestras se enviaron las muestras de intestinos de abejas procesados de forma individual de Santa María junto con un subconjunto de 5 muestras de abejas procesadas de forma colectiva de cada isla. Tras analizar los resultados de este primer lote, se procesaron y enviaron el resto de las muestras (10 muestras por cada isla).

### **3.3. Construcción de librerías, secuenciación y asignación taxonómica**

La empresa Novogene Co. realizó la amplificación por PCR con los cebadores 27F (5'- AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'- RGYTACCTTGTTACGACTT-3') del gen *ARNr 16S* completo. También realizó la construcción de las librerías genéticas, el control de calidad del producto de PCR y la secuenciación utilizando el sistema *PacBio Sequel II/IIe* (Pacific Biosciences, CA, Estados Unidos), de acuerdo con la concentración efectiva de la librería genética y la cantidad de datos requerida. Las secuencias obtenidas con longitudes inferiores a 1340 pb y superiores a 1640 pb se eliminaron. Las restantes, dentro del rango de longitud del amplicón, se guardaron en formato *fastq*. De estas últimas, se eliminaron los cebadores para depurar las secuencias con el mismo número de nucleótidos, obteniendo así los datos finales validados para el análisis posterior. Posteriormente, también realizó la asignación taxonómica de las variantes de secuencias de los amplicones obtenidos (*Amplicon Sequence Variants*, ASV) y eliminaron aquellas que tuvieran menos de 5 lecturas.

### 3.4. Análisis bioinformáticos y estadísticos

Una vez realizada la asignación taxonómica, el número de secuencias en cada muestra se normalizó a un valor común, permitiendo así la comparación directa entre las muestras de ambas secuenciaciones. Este proceso se llevó a cabo mediante una rarefacción utilizando el paquete *vegan* de *R Studio* (versión 4.3.2). A partir de esto, se generó una tabla de recuentos de todos los taxones para cada muestra y se calculó la abundancia relativa de cada uno en función del número total de lecturas rarefactadas del gen *ARNr 16S* por muestra.

Dado que las muestras individuales y las muestras procesadas colectivamente no son comparables entre sí debido a su naturaleza distinta (número de abejas por muestra y parte de la abeja analizada), no se realizó una comparación entre ambos tipos de muestras. Por lo tanto, las comparaciones estadísticas sólo se realizaron con las muestras procesadas de forma colectiva de cada isla, dejando las muestras individuales de Santa María para la descripción de la microbiota intestinal de las abejas de esta isla.

Para analizar la riqueza y uniformidad de las comunidades bacterianas en las muestras (diversidad alfa), se estudiaron los índices de Shannon y de Simpson con el paquete *vegan* de *R Studio* (versión 4.3.2). Primero, se comparó la microbiota de las abejas de las diferentes islas (cada una con una combinación exclusiva de patógenos) para evaluar si existían diferencias entre ellas en función de la isla/combinación de patógenos. Las diferencias entre los grupos en los índices de Shannon y Simpson se evaluaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples. En caso de diferencias significativas, se realizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney con corrección de Bonferroni para comparaciones entre pares.

Para evaluar la complejidad de la composición de la comunidad bacteriana (diversidad beta), se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (*Principal Coordinates Analysis*, PCoA) con una matriz de distancias que calculaba valores de disimilitud para cada comparación de muestras por pares y, de esta manera, trazar patrones de diversidad de la comunidad bacteriana. La abundancia relativa se analizó mediante el índice de disimilitud de Bray-Curtis, mientras que para la presencia/ausencia de cada taxón se utilizó el índice binario de Jaccard. Las diferencias estadísticas en las matrices

de distancia se evaluaron mediante un análisis de varianza no paramétrico (PERMANOVA) con 999 permutaciones, utilizando la prueba Adonis implementada en el paquete *vegan* de *R Studio* (versión 4.3.2).

Tras analizar la diversidad alfa y beta, se comparó la abundancia relativa de los principales géneros bacterianos utilizando la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples y la prueba no paramétrica Mann-Whitney para comparaciones entre pares.

Posteriormente, las muestras se agruparon en función de la presencia o ausencia de los diferentes parásitos. Para *V. destructor* y *N. ceranae*, las muestras se agruparon en función de su presencia en las islas. En el caso de *N. ceranae*, además, se disponía del dato de que colmenas eran positivas al microsporidio, ya que esas muestras se habían analizado en el CIAPA (Lopes *et al.* 2022), por lo que las muestras de islas con presencia de *N. ceranae* (Terceira y Pico) se agruparon en función de si eran o no positivas a este patógeno. Para *L. passim*, dado que se encuentra presente en todas las islas, el análisis se realizó en función de la presencia o ausencia en cada colmena analizada utilizando los datos obtenidos en el **Capítulo II**. De esta manera se generaron dos grupos para cada una de las variables de análisis: con y sin *V. destructor*; con y sin *N. ceranae*; y con y sin *L. passim*. Para estos tres factores, se repitieron los mismos análisis descritos anteriormente. Sin embargo, en estos casos únicamente se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparaciones por pares.

De forma similar al análisis del factor isla con una combinación diferente de patógenos en cada una, se realizó una comparación entre colmenas con *N. ceranae* y/o *L. passim* para evaluar su influencia de forma conjunta en la microbiota intestinal.

Los valores de  $p < 0,05$  resultantes de todos los análisis estadísticos realizados se consideraron como estadísticamente significativos.

### 3.5. Detección de *N. ceranae*

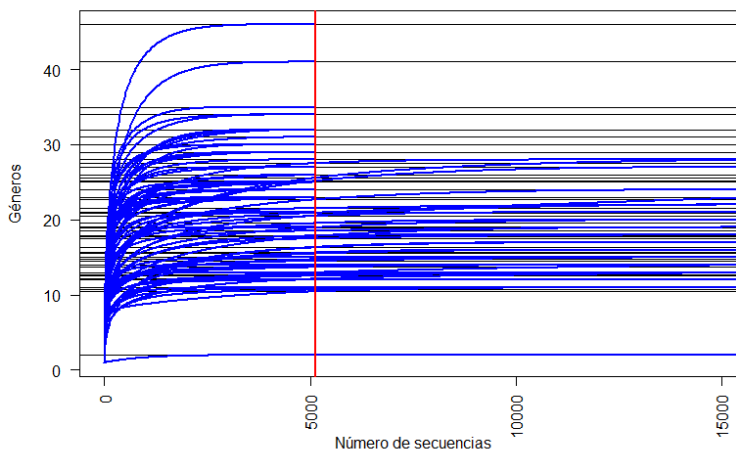
Dado que las abejas procesadas colectivamente ya habían sido analizadas previamente para la detección de *N. ceranae* (Lopes *et al.* 2022) en nuestro laboratorio, únicamente se analizaron las abejas individuales muestreadas de Santa María para confirmar que se encontraban libres del microsporidio, ya que esa isla es considerada libre de este. Se realizó una PCR

convencional de las mismas utilizando la misma técnica descrita en la **Metodología general**.

#### 4. RESULTADOS

El proceso de secuenciación produjo 3.304.683 secuencias de alta calidad del gen *ARNr 16S* tras el filtrado, pertenecientes a 663 y 1.258 ASVs en el primer y el segundo lote de muestras, respectivamente. Se identificaron un total de 72 géneros pertenecientes a 11 filos.

En el primer lote de muestras analizadas, la empresa Novogene Co. normalizó el número de secuencias a 15.957, mientras que en el segundo lo hizo a 5.123 secuencias. Para estandarizar los datos y facilitar la comparación entre ambas secuenciaciones, se realizó una rarefacción en la que se ajustaron todas las muestras a 5.123 secuencias (**Figura 25**). Se seleccionó este valor porque permitía incluir toda la información de las muestras de la segunda secuenciación, y la información más relevante de las muestras de la primera.



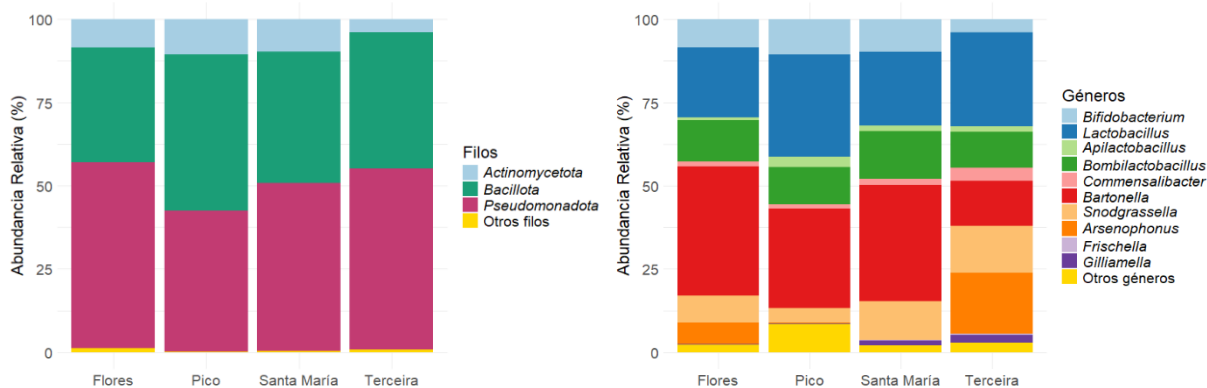
**Figura 25.** Curva de rarefacción en las muestras secuenciadas en los dos lotes para su estudio metataxonómico. La gráfica muestra la riqueza de géneros (eje Y) en función del número de secuencias (eje X), con las curvas en azul representando las diferentes muestras. La línea vertical roja marca el valor de 5.123 secuencias, el punto de rarefacción aplicado para todas las muestras.

#### 4.1. Caracterización de la microbiota intestinal de las abejas de las islas Azores

La caracterización de la microbiota intestinal de las abejas en las islas Azores se realizó mediante el análisis de los taxones identificados en las muestras colectivas correspondientes a las 4 islas seleccionadas para este estudio. En el total general de las muestras de las diferentes islas, los filos más representativos fueron Pseudomonadota (50,66%), Bacillota (40,46%) y Actinomycetota (8,19%), que representaron el 99,31% de las lecturas totales (**Figura 26**).

Dentro del filo Bacillota, la clase Bacilli fue la mayoritaria (40,12%); las clases con más representación del filo Pseudomonadota fueron la Alphaproteobacteria (31,46%), la Gammaproteobacteria (9,87%) y la Betaproteobacteria (9,59%), mientras que la clase Actinomycetes fue la más abundante (8,18%) dentro del filo Actinomycetota. Dentro de la clase Alphaproteobacteria, la familia más representativa fue Bartonellaceae (29,27%), seguida de Acetobacteraceae (2,18%), mientras que Morganellaceae (6,20%) y Orbaceae (1,26%) fueron las más abundantes dentro de la clase Gammaproteobacteria. Por último, las clases Bacilli, Betaproteobacteria y Actinomycetes, se correspondieron mayoritariamente con las familias Lactobacillaceae (39,50%), Neisseriaceae (9,58%) y Bifidobacteriaceae (8,17%), respectivamente.

A nivel de género (**Figura 26**), se detectaron los géneros característicos de la microbiota intestinal de las abejas melíferas: el 29,27% de las secuencias se atribuyeron al género *Bartonella*, el 25,56% a *Lactobacillus*, el 12,17% a *Bombilactobacillus*, el 9,58% a *Snodgrassella*, seguido del 8,17% de *Bifidobacterium*, el 6,19% a *Arsenophonus*, el 2,15% a *Commensalibacter*, y el 1,77% a *Apilactobacillus*. Además, dentro de la familia *Orbaceae*, el 1,04% se asignó a *Gilliamella* y el 0,22% a *Frischella*. Estos géneros representaron el 96,12% de las lecturas totales. El resto de los géneros asignados se encontraron en abundancias relativas muy bajas y correspondieron al 3,88% de las secuencias totales, aunque si bien es cierto que Pico fue la isla que mostró una mayor abundancia de estos géneros (8,51%) y Santa María la que menos (2,01%).



**Figura 26.** Abundancia relativa de los filis (izquierda) y los géneros bacterianos (derecha) determinados por secuenciación en las diferentes islas.

La asignación taxonómica de los ASVs a nivel de especie permitió detectar entre los *Lactobacillus* las especies *Lactobacillus helsingborgensis* (9,97%), *Lactobacillus kullabergensis* (4,96%), *Lactobacillus apis* (4,72%), y en menor proporción, *Lactobacillus melliventris* (0,12%), *Lactobacillus johnsonii* (0,012%) y *Lactobacillus kimbladii* (0,0013%). El 5,57% de las secuencias correspondientes al género *Lactobacillus* no pudieron ser asignadas a nivel de especie. Del género *Bombilactobacillus*, se identificaron 2 especies, *Bombilactobacillus mellis* (10,99%) y *Bombilactobacillus mellifer* (1,18%). En cuanto al género *Bifidobacterium*, se identificaron tres especies, una predominante, *Bifidobacterium asteroides* (7,50%); y dos en menor abundancia, *Bifidobacterium indicum* (0,67%) y *Bifidobacterium coryneforme* (0,005%). De los géneros *Bartonella*, *Snodgrassella*, *Apilactobacillus*, *Gilliamella* y *Frischella*, se identificó una especie para cada uno de ellos: *Bartonella apis* (26,41%), *Snodgrassella alvi* (7,29%), *Apilactobacillus kumkeii* (1,77%), *Gilliamella apicola* (0,44%) y *Frischella perrara* (0,22%). Se identificaron otras especies en proporciones mucho menores, representando en conjunto el 0,74% de las lecturas totales. En promedio, se pudo identificar a nivel de especie el 76,99% del total de las secuencias obtenidas en las islas analizadas.

#### 4.1.1. Microbiota intestinal de las abejas de Santa María

Los resultados de la PCR para la detección específica de *N. apis* y *N. ceranae* mostraron que todas las muestras obtenidas de forma individual a partir de las abejas de Santa María eran negativas para ambos microsporidios.

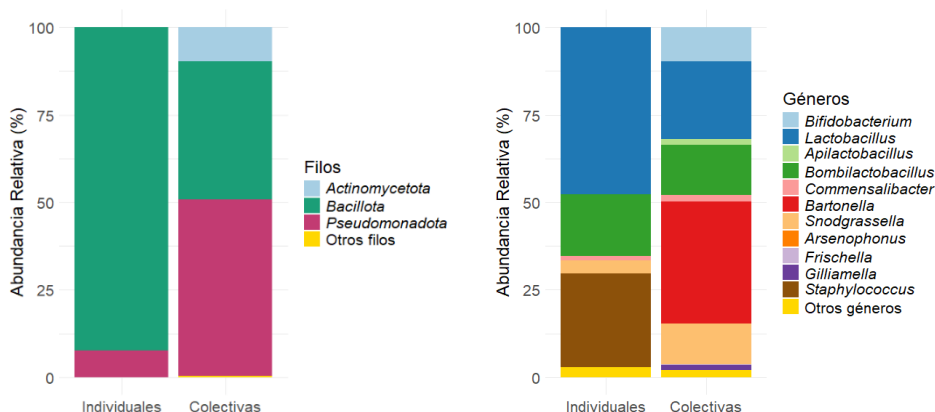
Los resultados metataxonómicos de la microbiota intestinal de las abejas de Santa María, isla libre de *N. ceranae* y *V. destructor*, se obtuvieron utilizando tanto las muestras individuales como las recogidas de forma colectiva.

El análisis de las muestras individuales mostró predominancia del filo Bacillota (92,29% de las lecturas totales), mientras que el filo Pseudomonadota representó únicamente el 7,70% y no hubo casi presencia de secuencias correspondientes al filo Actinomycetota. Sin embargo, en el caso de las muestras colectivas, la abundancia de estos filios fue distinta (39,55%, 50,28% y 9,69%, respectivamente) (**Figura 27**).

A nivel de clase, se observaron también ciertas diferencias entre las muestras individuales y colectivas. En las muestras individuales, la clase Bacilli fue la más abundante con un 87,67% de las lecturas, dentro de la cual los órdenes predominantes en las muestras individuales fueron *Lactobacillales* (65,46%) y *Staphylococcales* (26,80%), con una representación muy limitada de otros órdenes. En contraste, en las muestras colectivas, la clase Bacilli representó el 38,39% de las secuencias, aumentando la abundancia de otras clases como Alphaproteobacteria (36,95%), Betaproteobacteria (11,46%) y Gammaproteobacteria (2,91%). Hay que destacar que esta última únicamente se encontró en este grupo de muestras. A nivel de familias, se observó un dominio claro de *Lactobacillaceae* (65,44%), seguido por *Staphylococcaceae* (26,80%), en las muestras individuales. Sin embargo, en las colectivas, se observó una mayor diversidad, con *Bartonellaceae* como la familia predominante (34,95%), seguida de *Lactobacillaceae* (38,20%) y *Neisseriaceae* (11,46%).

En cuanto a los géneros identificados (**Figura 27**), *Lactobacillus* (47,69%) fue el género dominante en las muestras individuales, seguido por *Staphylococcus* (26,80%) y *Bombilactobacillus* (17,75%). No obstante, en las muestras colectivas, *Bartonella* sobresalió con una abundancia del 34,95%,

mientras que *Lactobacillus* (22,30%) y *Bombilactobacillus* (14,25%) estuvieron presentes en menor abundancia. Otros géneros como, *Snodgrassella*, *Commensalibacter* y *Gilliamella* tuvieron una mayor representación en las muestras colectivas (34,95%, 11,46%, 1,98% y 1,54%, respectivamente) que en las individuales (3,73%, 1,11% y 0,04%, respectivamente). Asimismo, la representación del género *Bifidobacterium* en estas últimas fue prácticamente nula (0,001%). Los géneros *Bartonella*, *Apilactobacillus*, *Frischella* y *Arsenophonus* no mostraron ninguna secuencia en las muestras individuales. En conjunto, todos estos géneros representaron el 97,41% de las lecturas totales en las muestras individuales y el 97,99% en las colectivas.



**Figura 27.** Abundancia relativa de los filios (izquierda) y los géneros bacterianos (derecha) determinadas por secuenciación en las muestras procesadas individualmente y colectivas de la isla de Santa María.

Las especies identificadas en cada género se muestran en la **Tabla 20**. Las del género *Lactobacillus* que se pudieron identificar a este nivel taxonómico tuvieron una mayor abundancia relativa en las muestras individuales que en las colectivas, aunque el perfil de especies fue similar en ambos tipos de muestras. Así, en ambos grupos, la especie predominante fue *L. helsingborgensis* (12,70% de las secuencias totales en las muestras individuales y 8,56% en las colectivas). Le siguieron *L. apis* (8,94% y 4,59%, respectivamente) y *L. kullabergensis* (8,72% y 4,16%, respectivamente). Por su parte, *L. melliventris* fue la especie con menor representación dentro de este género en ambos grupos, mientras que no se pudo detectar o identificar *L. johnsonii* en las muestras individuales.

En cuanto al género *Bombilactobacillus*, *B. mellis* fue la especie predominante (17,37% y 12,89%, respectivamente), mientras que *B. mellifer* tuvo una representación menor (0,38% y 1,37%, respectivamente).

*Staphylococcus succinus* fue la única especie de su género identificada entre las muestras analizadas. Por otra parte, *Ba. apis* destacó por una notable abundancia en las muestras colectivas (32,60%) en contraste con lo observado en las individuales (0,02%). Algo similar, aunque en menor medida, sucedió con *S. alvi*, cuya presencia fue claramente mayor en las muestras colectivas (8,10%) que en las individuales (3%).

Aunque se pudieron identificar otras especies bacterianas, su abundancia relativa fue muy baja, alcanzando apenas un 0,07% del total de las lecturas en las muestras individuales y un 0,22% en las colectivas. Por lo tanto, la asignación taxonómica a nivel de especie llegó hasta el 78,52% de las secuencias en las muestras individuales y el 84,84% en las colectivas.

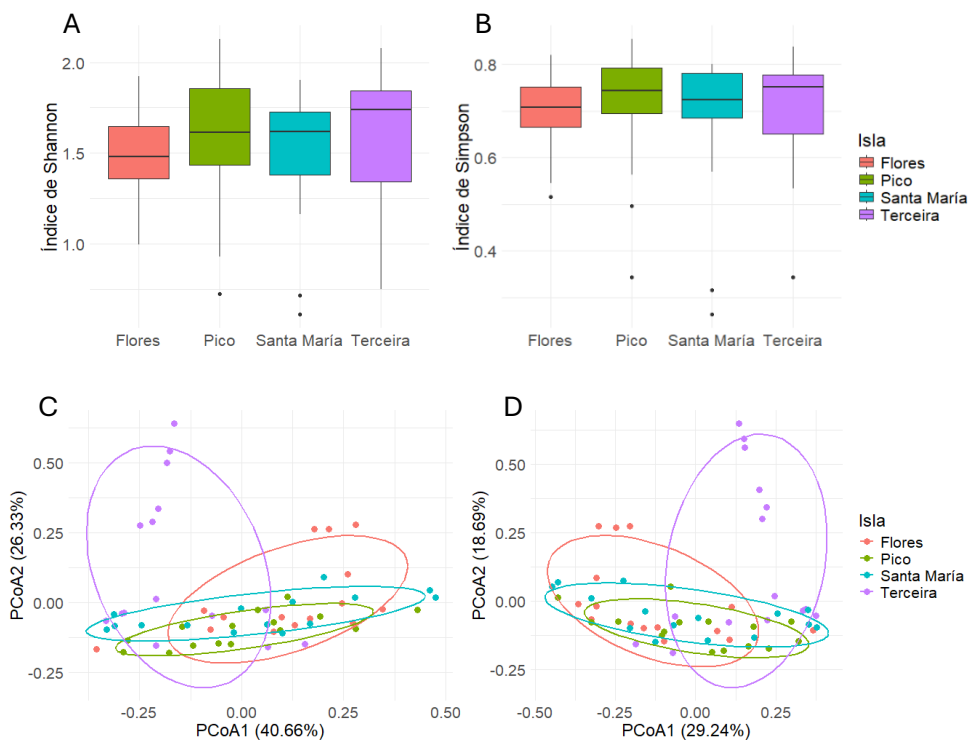
Géneros/especies	Abundancia relativa (%)	
	Muestras Individuales	Muestras Colectivas
<b><i>Lactobacillus</i></b>	47,69	22,30
<i>L. helsingborgensis</i>	12,70	8,56
<i>L. apis</i>	8,94	4,59
<i>L. kullabergensis</i>	8,72	4,16
<i>L. melliventris</i>	0,48	0,02
<i>L. johnsonii</i>	0,00	0,04
<b><i>Bombilactobacillus</i></b>	17,75	14,25
<i>B. mellis</i>	17,37	12,89
<i>B. mellifer</i>	0,38	1,37
<b><i>Apilactobacillus</i></b>	0,00	1,64
<i>A. kunkelii</i>	0,00	1,64
<b><i>Bartonella</i></b>	0,29	34,95
<i>Ba. apis</i>	0,02	32,60
<b><i>Bfidobacterium</i></b>	0,00	9,63
<i>B. asteroides</i>	0,00	8,92
<i>B. indicum</i>	0,00	0,72
<b><i>Snodgrassella</i></b>	3,73	11,46
<i>S. alvi</i>	3,00	8,10
<b><i>Gilliamella</i></b>	0,04	1,54
<i>G. apicola</i>	0,02	0,79
<b><i>Frischella</i></b>	0,00	0,22
<i>F. perrara</i>	0,00	0,22
<b><i>Staphylococcus</i></b>	26,80	0,00
<i>S. succinus</i>	26,80	0,00
<b>Otros géneros</b>	2,59	2,01
<b>Otras especies</b>	0,07	0,22

Tabla 20. Géneros y especies identificadas en las muestras de Santa María.

#### 4.2. Comparación de las comunidades bacterianas de las abejas entre las diferentes islas

Cuando se comparó la diversidad alfa entre las muestras procedentes de las diferentes islas, no se observaron diferencias significativas ni en el índice de Shannon (Kruskal-Wallis,  $p=0,66$ ) ni en el índice de Simpson (Kruskal-Wallis,  $p=0,79$ ). Sin embargo, cuando se analizó la composición de las

comunidades bacterianas (diversidad beta) se observaron diferencias tanto en términos de abundancia relativa (Bray-Curtis,  $p < 0,001$ ; **Figura 28**) como de presencia/ausencia (Binary-Jaccard,  $p < 0,001$ ; **Figura 28**). Terceira fue la isla que mostró un perfil metataxonómico bacteriano diferente a cualquier otra isla en los dos análisis realizados, mostrando diferencias significativas con la isla Flores (Bray-Curtis,  $p = 0,01$ ; Binary-Jaccard,  $p = 0,006$ ), Pico (Bray-Curtis,  $p = 0,006$ ; Binary-Jaccard,  $p = 0,006$ ) y con la Santa María (Bray-Curtis,  $p = 0,028$ ; Binary-Jaccard,  $p = 0,024$ ).

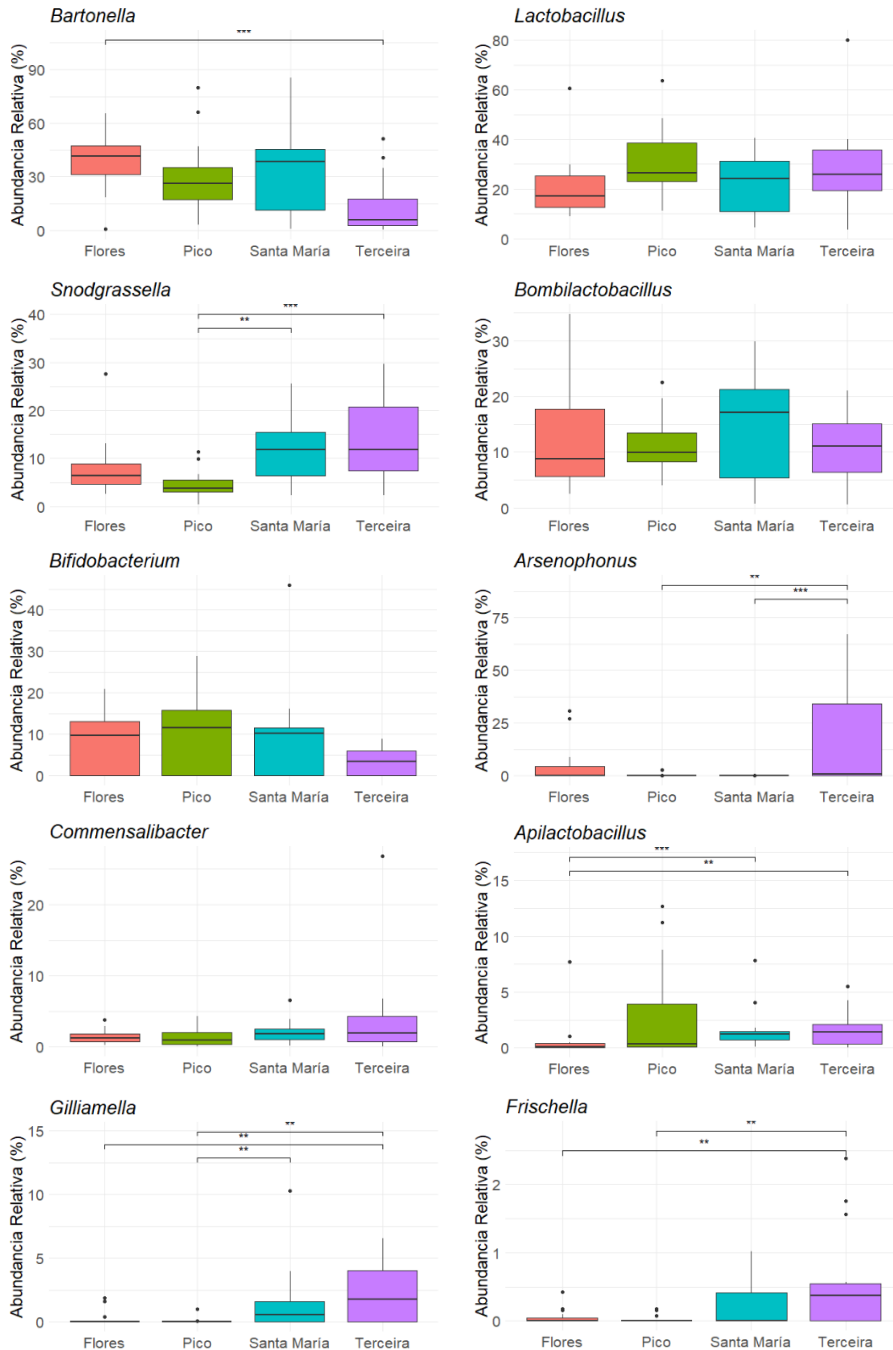


**Figura 28.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función de la isla a la que pertenecen. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

Al analizar la abundancia de los géneros mayoritarios en cada isla, se identificaron diferencias significativas entre ellas (**Figura 29**). Las muestras procedentes de las abejas de la isla Terceira mostraron una mayor abundancia

de varios de los géneros estudiados, como *Gilliamella* y *Frischella*, en comparación con Flores (Mann-Whitney,  $p=0,031$ ;  $p=0,044$ , respectivamente) y Pico (Mann-Whitney,  $p=0,013$ ;  $p=0,013$ , respectivamente). Además, se observó una mayor abundancia de *Snodgrassella* (Mann-Whitney,  $p=0,003$ ) y *Arsenophonus* (Mann-Whitney,  $p=0,01$ ) en Terceira con respecto a Pico y, en el caso de *Arsenophonus*, también con respecto a Santa María (Mann-Whitney,  $p=0,0016$ ). Asimismo, *Apilactobacillus* fue más abundante en Terceira en relación con Flores ( $p=0,031$ ). Sin embargo, *Bartonella* tuvo una abundancia significativamente menor en Terceira que en Flores (Mann-Whitney,  $p=0,005$ )

Por otro lado, Santa María presentó una mayor abundancia de *Snodgrassella* en comparación con Pico (Mann-Whitney,  $p=0,016$ ), al igual que una mayor abundancia de *Apilactobacillus* respecto a Flores (Mann-Whitney,  $p=0,0041$ ). *Gilliamella* también mostró una mayor abundancia en Santa María en comparación con Pico (Mann-Whitney,  $p=0,027$ ).

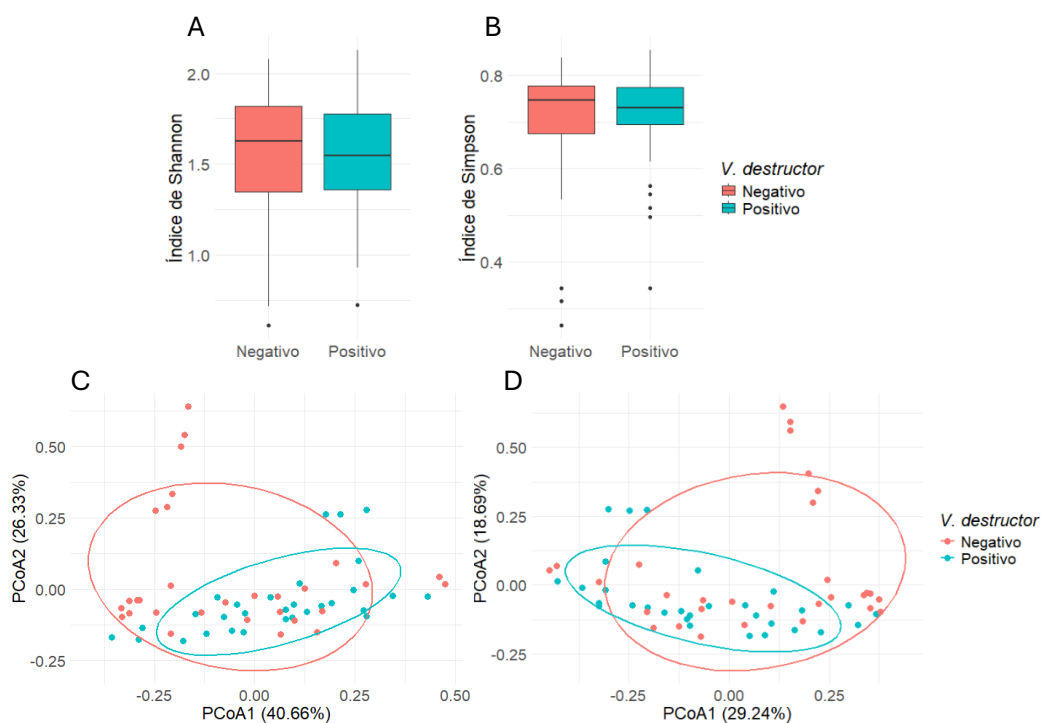


**Figura 29.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas de las diferentes islas analizadas. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 4.3. Efecto de la presencia de parásitos en la microbiota intestinal de las abejas melíferas

#### 4.3.1. *Varroa destructor*

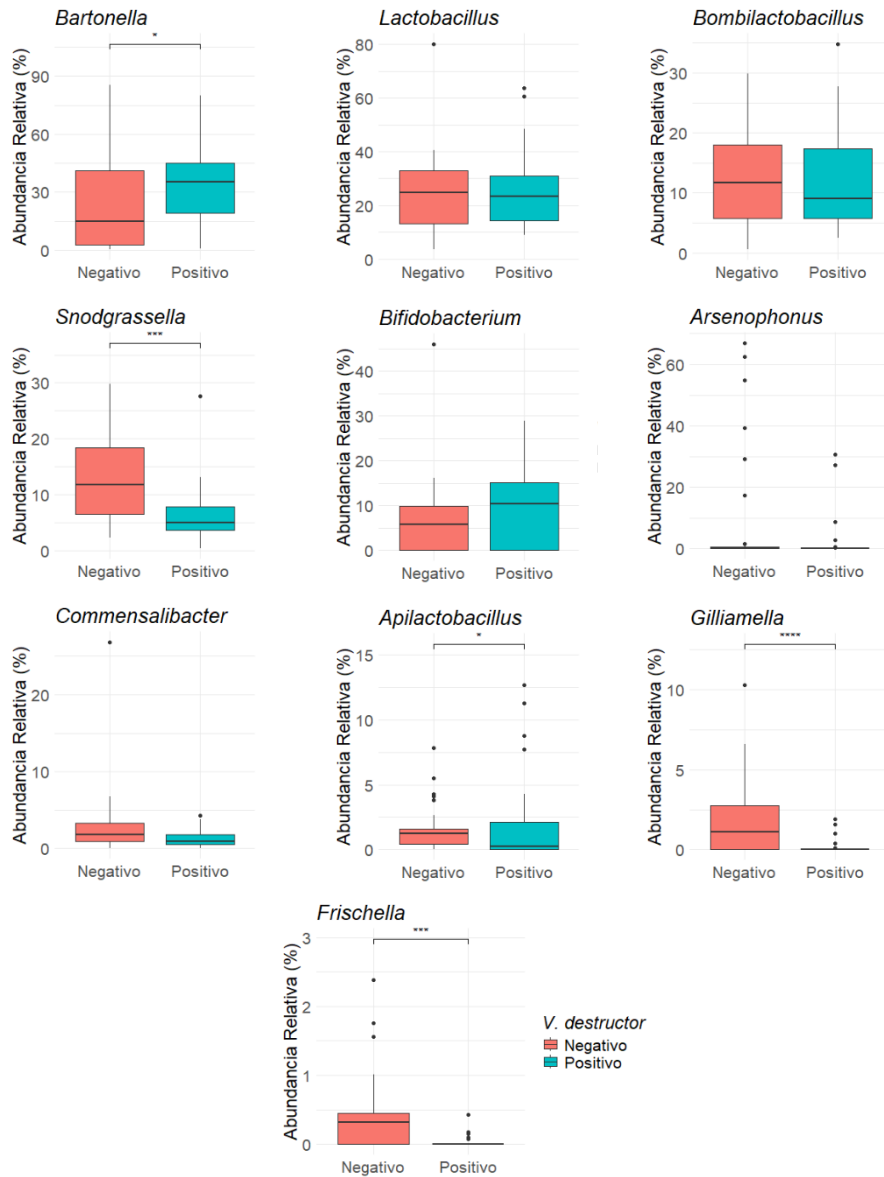
La comparación entre islas con presencia o ausencia de *V. destructor* no mostró diferencias significativas en la diversidad alfa, ni en el índice de Shannon (Mann-Whitney,  $p=0,85$ ) ni el de Simpson (Mann-Whitney,  $p=0,97$ ); sin embargo, el análisis de la diversidad beta sí reveló diferencias, tanto en la abundancia relativa (Bray-Curtis,  $p=0,004$ ) como en la presencia/ausencia de ASVs (Binary-Jaccard,  $p=0,006$ ) (**Figura 30**).



**Figura 30.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *V. destructor* en las islas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

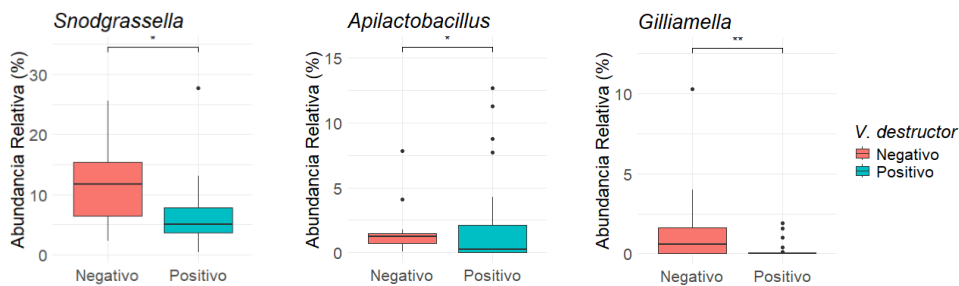
El análisis a nivel de género reveló que la abundancia relativa de *Bartonella* fue significativamente mayor en las islas en las que el ácaro está

presente (Mann-Whitney,  $p=0,049$ ) mientras que otros géneros, como *Snodgrassella* (Mann-Whitney,  $p=0,00037$ ), *Apilactobacillus* (Mann-Whitney,  $p=0,016$ ), *Gilliamella* (Mann-Whitney,  $p<0,0001$ ) o *Frischella* (Mann-Whitney,  $p=0,00084$ ), se encontraron en una abundancia significativamente menor en comparación con las islas donde *V. destructor* no está presente (**Figura 31**).



**Figura 31.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *V. destructor* en las islas. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Dado que la isla de Terceira, isla libre de *V. destructor*, mostró un perfil bacteriano diferente al resto de islas, se realizaron análisis adicionales excluyendo a Terceira para evitar su influencia en los resultados globales. Este análisis confirmó la ausencia de diferencias en la diversidad alfa entre las muestras de las restantes islas (Mann-Whitney,  $p=0,86$  y  $p=0,8$ , para el índice de Shannon y Simpson, respectivamente). Además, tampoco se observaron diferencias significativas en la diversidad beta (Bray-Curtis,  $p=0,28$ ; Binary-Jaccard,  $p=0,16$ ). A pesar de ello, algunos géneros bacterianos vieron alterada su abundancia relativa, como *Snodgrassella* (Mann-Whitney,  $p=0,011$ ), *Apilactobacillus* (Mann-Whitney,  $p=0,027$ ) o *Gilliamella* (Mann-Whitney,  $p=0,0013$ ), cuya abundancia fue menor en las islas con *V. destructor* (**Figura 32**), por lo que se confirmó su influencia en estos géneros bacterianos.



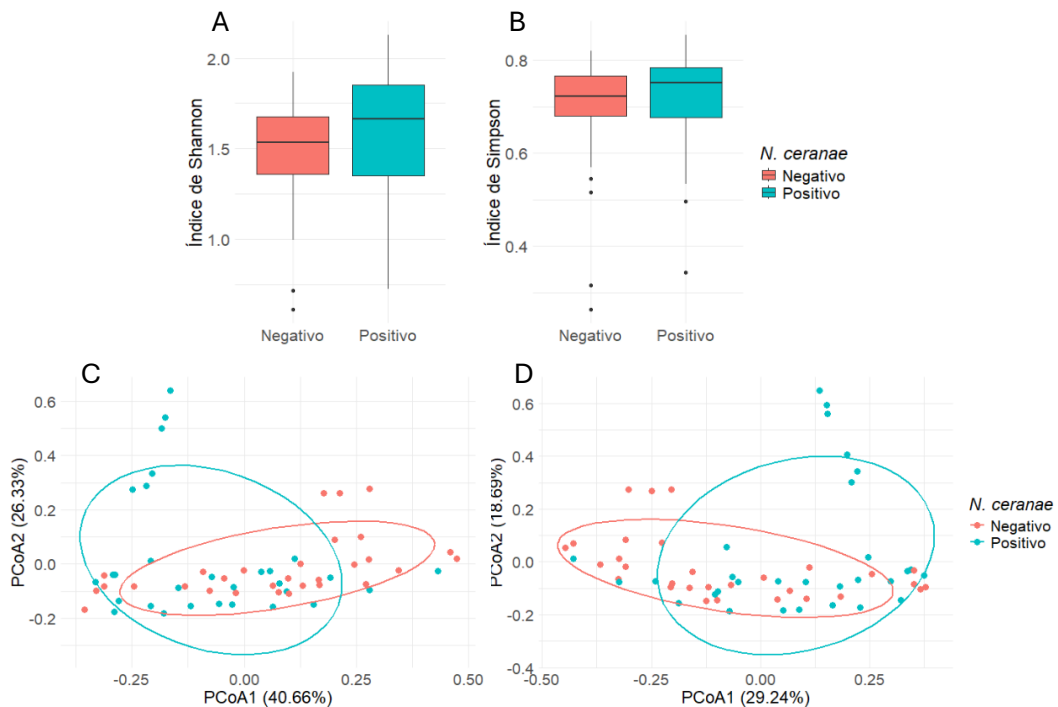
**Figura 32.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *V. destructor* en las islas excluyendo a Terceira del análisis. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.3.2. *N. ceranae*

Para evaluar el impacto de *N. ceranae* en la microbiota intestinal de las abejas, se analizó su presencia tanto a nivel insular como a nivel de colmena.

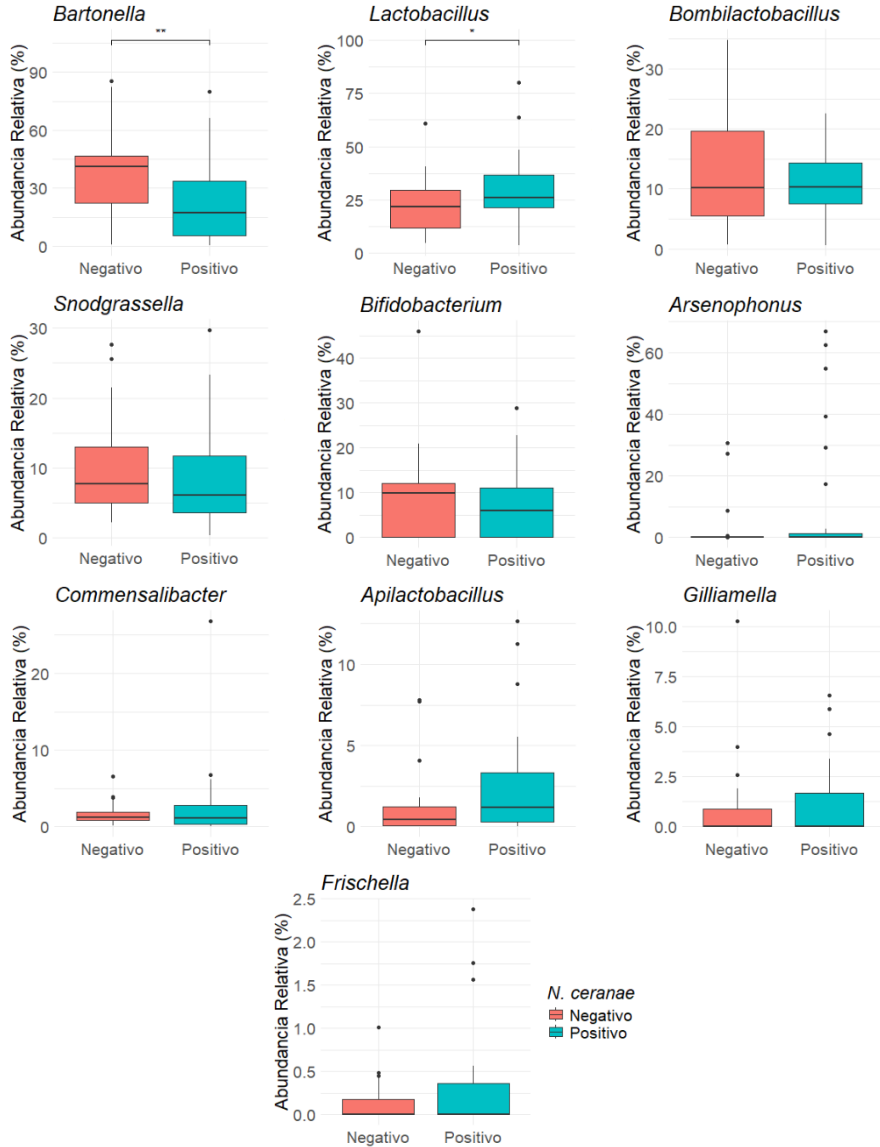
A nivel insular, no se observaron diferencias en los índices de Shannon (Mann-Whitney,  $p=0,22$ ) y Simpson (Mann-Whitney,  $p=0,33$ ) entre las islas con presencia de *N. ceranae* y aquellas en las que está ausente (**Figura 33**). Es decir, la diversidad alfa bacteriana no mostró diferencias significativas entre abejas de islas que nunca han estado expuestas a *N. ceranae* en comparación con las que procedían de islas en las que sí está presente. Sin embargo, sí se detectaron diferencias con respecto a la diversidad beta según el análisis PERMANOVA tanto en función de la abundancia relativa (Bray-Curtis,

$p=0,012$ ) como en la presencia/ausencia de taxones (Binary-Jaccard,  $p=0,004$ ) (Figura 33).



**Figura 33.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *N. ceranae* en las islas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

Al analizar las abundancias relativas de los géneros mayoritarios, se observó que las abejas procedentes de islas con presencia de *N. ceranae* mostraron una menor abundancia relativa del *Bartonella* (Mann-Whitney,  $p=0,007$ ) y una mayor abundancia de *Lactobacillus* (Mann-Whitney,  $p=0,032$ ). Para el resto de los géneros, la presencia de *N. ceranae* en las islas no tuvo un impacto significativo en su abundancia relativa (Figura 34).

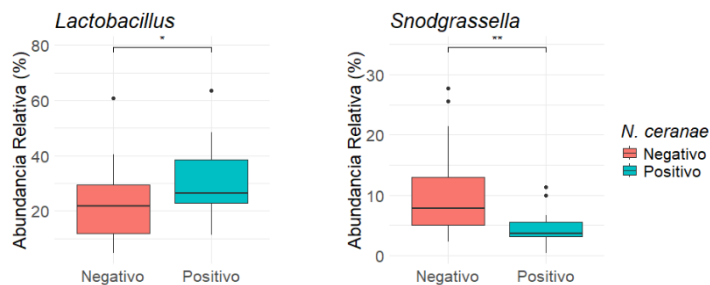


**Figura 34.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las islas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Al igual que en el caso de *V. destructor*, se realizó un nuevo análisis excluyendo la isla Tercera con el fin de reducir el impacto de esta isla en los resultados. Como ocurriera en aquel caso, no se encontraron diferencias significativas en la diversidad alfa (Mann-Whitney,  $p = 0,35$  y  $p = 0,38$  para el

índice de Shannon y el de Simpson respectivamente) mientras que sí existieron diferencias en la diversidad beta, tanto en la abundancia relativa (Bray-Curtis,  $p=0,029$ ) como en la presencia/ausencia (Binary-Jaccard,  $p=0,027$ ) de los diferentes taxones.

En cuanto a las abundancias relativas de cada uno de los géneros, se confirmó que la presencia de *N. ceranae* aumenta la abundancia del género *Lactobacillus* (Mann-Whitney,  $p=0,0028$ ) mientras que se perdió la significancia para *Bartonella* (Mann-Whitney,  $p=0,18$ ). Por otro lado, *Snodgrassella* se encontró en una abundancia significativamente mayor en las islas libres del microsporidio (Mann-Whitney,  $p=0,0012$ ) (**Figura 35**).

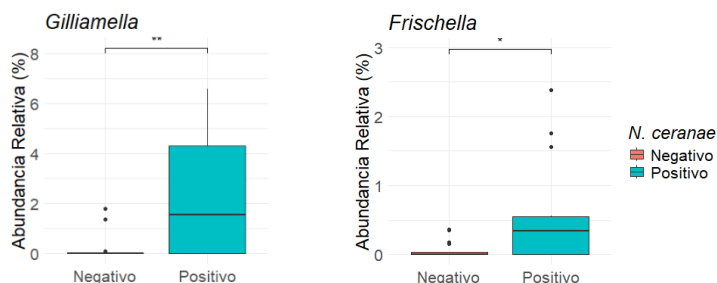


**Figura 35.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las islas excluyendo a Terceira del análisis. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Por lo que respecta al análisis en función de la presencia o ausencia de *N. ceranae* en las colmenas de las islas donde el microsporidio está presente, se observó que 16 de las 30 colmenas incluidas en este análisis eran positivas al microsporidio mientras que las 14 restantes eran negativas (datos incluidos en Lopes *et al.* (2022)).

No se encontraron diferencias significativas ni en la diversidad alfa (Mann-Whitney,  $p=0,7$  y  $p=0,95$ , para el índice de Shannon y el de Simpson, respectivamente) ni en la diversidad beta (Bray-Curtis,  $p=0,16$ ; Binary-Jaccard,  $p=0,13$ ) cuando las muestras se analizaron en función de dicho parámetro. Sin embargo, sí que se observaron diferencias en la abundancias relativas de *Gilliamella* y *Frischella*, que fueron significativamente más elevadas en las

colmenas con *N. ceranae* (Mann-Whitney,  $p=0,0088$  y  $p=0,011$ , respectivamente) (**Figura 36**).

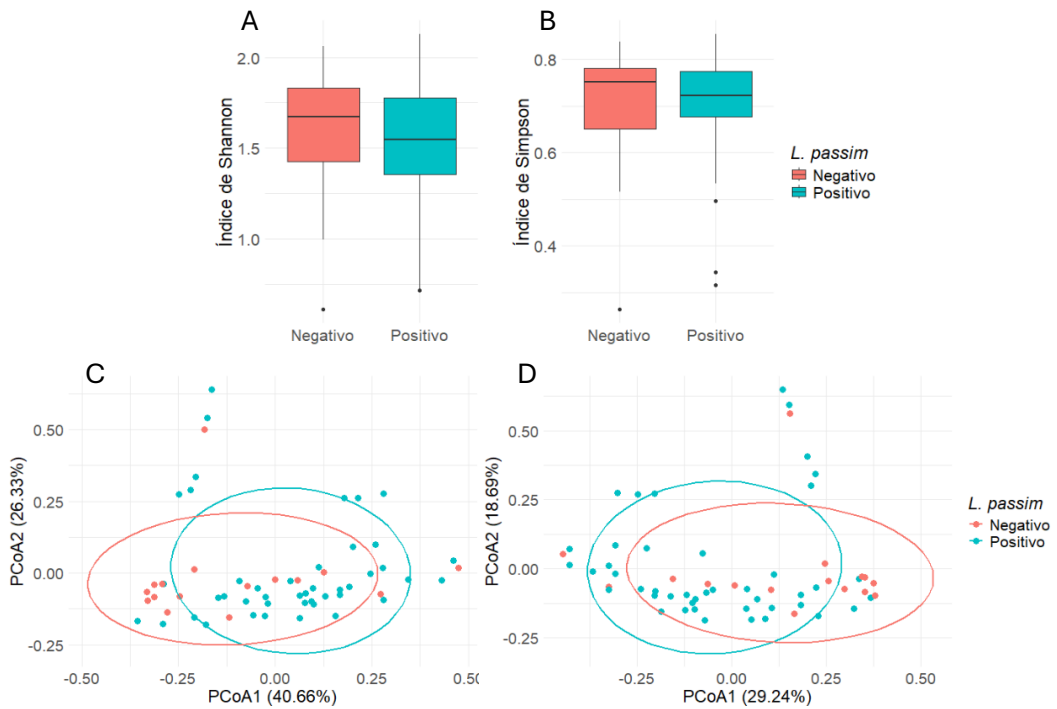


**Figura 36.** Abundancia relativa de los géneros que mostraron diferencias significativas en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *N. ceranae* en las colmenas de las islas donde se encuentra presente. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

#### 4.3.3. *L. passim*

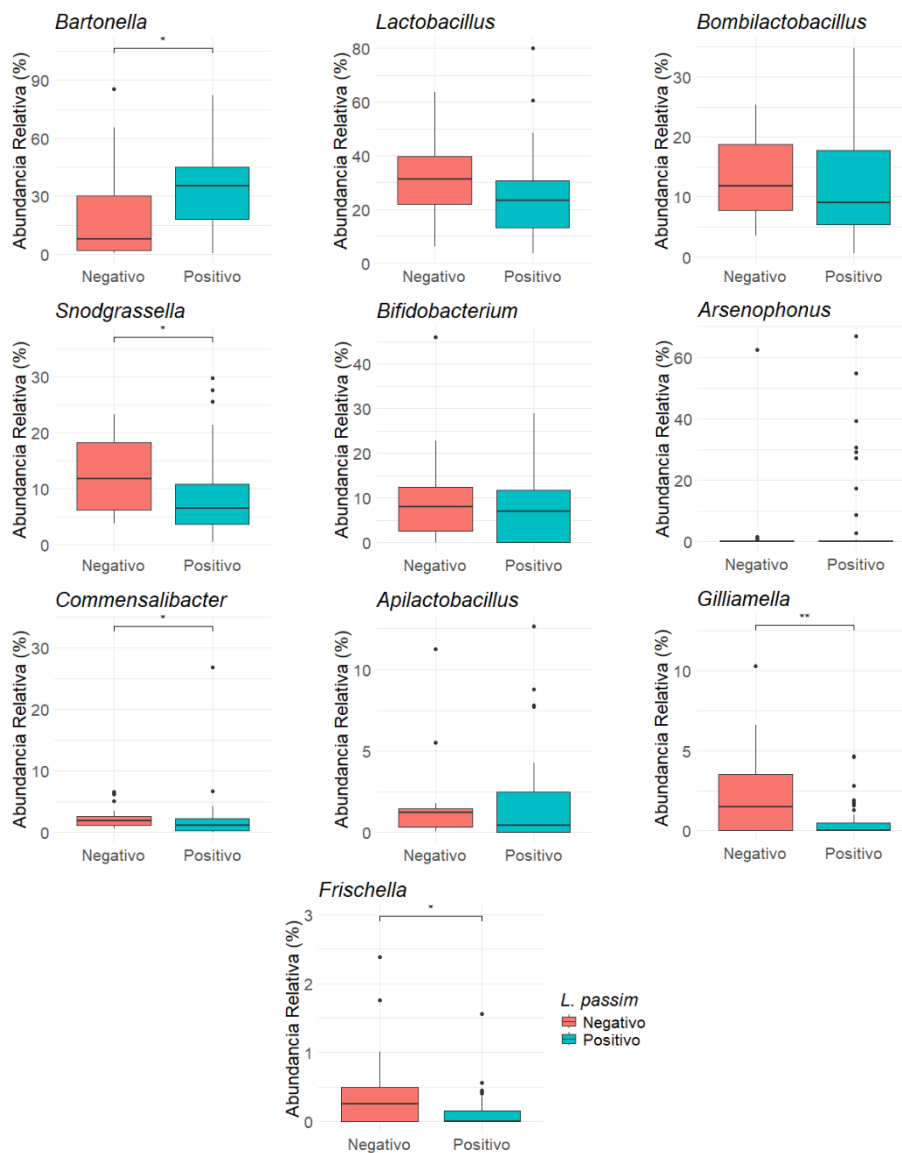
Dado que *L. passim* se encuentra distribuida por todo el archipiélago de las Azores, los análisis se realizaron en función de su presencia o ausencia en cada colmena, independientemente de la isla a la que pertenecieran. En total, 44 colmenas fueron positivas al tripanosomátido, mientras que las restantes 16 eran negativas (**Capítulo II**).

En este caso, tampoco se observaron diferencias significativas en la diversidad alfa (Mann-Whitney,  $p=0,55$  y  $p=0,7$ , para el índice de Shannon y el de Simpson, respectivamente) pero sí en cuanto a la diversidad beta (Bray-Curtis,  $p=0,044$ ; Binary-Jaccard,  $p=0,019$ ) (**Figura 37**).



**Figura 37.** Comparación de los valores de diversidad alfa y diversidad beta de las 60 muestras colectivas agrupadas en función la presencia de *L. passim* en las colmenas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráficos PCoA basados en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráficos PCoA basados en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

El análisis a nivel de género mostró que la abundancia de *Bartonella* fue significativamente mayor en las colmenas positivas a *L. passim* (Mann-Whitney,  $p=0,023$ ). Por el contrario, *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Frischella* y *Commensalibacter* fueron más abundantes en las colonias libres del tripanosomátido (Mann-Whitney,  $p=0,045$ ;  $p=0,0043$ ;  $p=0,043$  y  $p=0,048$ , respectivamente) (**Figura 38**).



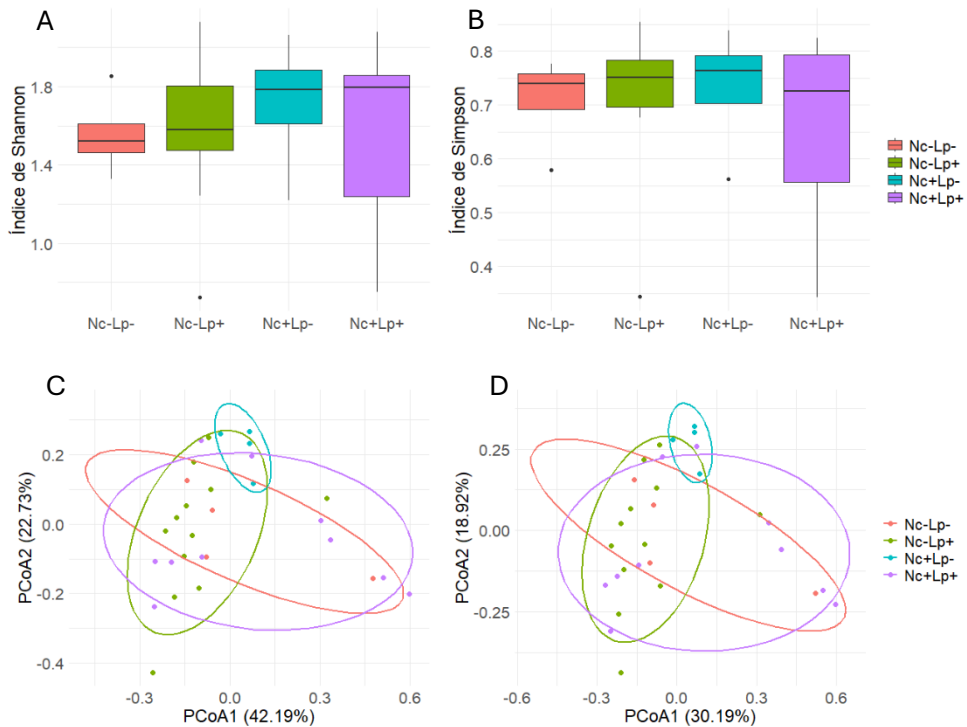
**Figura 38.** Abundancia relativa de los géneros más abundantes encontrados en las muestras de abejas analizadas agrupados en función de la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de *L. passim* en las colmenas. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Posteriormente, se realizó una comparación a nivel de colmena en función de la presencia o ausencia de *N. ceranae* y *L. passim*. El número de colmenas para cada una de las cuatro posibles combinaciones se refleja en la **Tabla 21**.

	<i>L. passim</i> (+)	<i>L. passim</i> (-)
<i>N. ceranae</i> (+)	10	4
<i>N. ceranae</i> (-)	12	4

**Tabla 21.** Número de colmenas con presencia (+) y/o ausencia (-) de *N. ceranae* y *L. passim*.

No se encontraron diferencias significativas ni en la diversidad alfa (índice de Shannon,  $p=0,92$ ; índice de Simpson,  $p=0,9$ ) ni en la beta (Bray-Curtis,  $p=0,17$ ; Binary-Jaccard,  $p=0,12$ ) sino únicamente una mayor tendencia hacia una mayor diversidad cuando las colmenas poseían ambos parásitos (**Figura 39**). Tampoco se observaron diferencias taxonómicas relevantes.



**Figura 39.** Comparación de los valores de diversidad alfa y beta en las muestras colectivas obtenidas en islas con presencia de *N. ceranae* y *L. passim* en función de la presencia (+) y/o ausencia (-) de estos dos parásitos en las colmenas. A) Índice de diversidad de Shannon; B) Índice de diversidad de Simpson; C) Gráfico PCoA basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis; D) Gráfico PCoA basado en el coeficiente de Jaccard para datos binarios (presencia-ausencia).

## 5. DISCUSIÓN

Este estudio es pionero en caracterizar la microbiota intestinal de abejas de localizaciones libres de dos de sus patógenos más prevalentes a nivel mundial, *V. destructor* y *N. ceranae*, que representan una amenaza para la salud de las colonias (Higes *et al.* 2008c; Cornman *et al.* 2010; Le Conte, Ellis y Ritter 2010; Stevanovic *et al.* 2011; Dietemann *et al.* 2012; Martínez, Leal y Conget 2012). Concretamente, la isla de Santa María es una de las pocas localizaciones en el mundo que, hasta la fecha, se encuentran libres de ambos patógenos (Lopes *et al.* 2022) por lo que convierte a esta isla en una región idónea para el estudio de las abejas antes de la expansión mundial de estos patógenos.

En este trabajo, las abejas procesadas individualmente, al ser abejas recién recogidas, la extracción del intestino se pudo realizar en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación ambiental y únicamente detectar y cuantificar las bacterias presentes en el intestino. En contraste, las abejas procesadas colectivamente se encontraban congeladas en nuestro banco de muestras y la extracción del intestino en este estado no fue posible puesto que, al extraer el intestino, éste se rompe y hace que la muestra no sea válida para su análisis, por lo que se analizaron las abejas completas. No obstante, para eliminar las bacterias existentes en la superficie de las abejas, se lavaron con etanol y agua Milli-Q estéril antes de su procesado en condiciones de esterilidad. En un estudio previo, Hammer *et al.* (2015) demostraron que la alta biomasa bacteriana en el intestino de las abejas anula cualquier efecto potencial de las posibles bacterias ambientales en la superficie de estas. Esto se confirmó en nuestro estudio, ya que más del 96% de las secuencias obtenidas en el análisis metataxonómico correspondieron a géneros bacterianos característicos de la microbiota intestinal de las abejas, lo que indica que la presencia de bacterias asociadas a otros tejidos fue mínima y poco significativa.

La principal diferencia entre las abejas de Santa María procesadas individualmente y las colectivas era la edad de estas. Las abejas de Santa María que se recogieron del cuadro de cría y que se procesaron de forma individual mostraron un perfil bacteriano diferente a las muestras colectivas, mostrando una abundancia mucho mayor de *Lactobacillus*, *Bombilactobacillus* y *Staphylococcus*. Estas abejas, al recogerse del cuadro de cría de la colmena, eran abejas muy jóvenes con poco tiempo desde su emergencia, a diferencia de las abejas

procesadas colectivamente, que se recogieron de los cuadros externos (Lopes *et al.* 2022) y probablemente tenían mayor edad. Es plausible que estas abejas jóvenes no hubieran desarrollado por completo su microbiota intestinal, lo que explicaría la mayor presencia de géneros como *Lactobacillus* y *Bombilactobacillus* y otras bacterias ambientales, como *Staphylococcus*, según se ha descrito previamente en los primeros días tras su emergencia (Powell *et al.* 2014; Dong *et al.* 2020; Cai *et al.* 2022).

En contraste, y al igual que en el resto de las islas, las muestras de abejas colectivas mostraron una abundancia elevada de las bacterias características de la microbiota intestinal descrita en las abejas, a pesar de que se encuentran en zonas geográficamente aisladas y con restricciones en el movimiento de colonias. Este hecho no es de extrañar puesto que las bacterias intestinales características de las abejas se han coadaptado y coevolucionado con ellas a lo largo de miles de años (Martinson *et al.* 2011; Vásquez *et al.* 2012; McFrederick *et al.* 2013; Koch *et al.* 2013). Sin embargo, la isla de Terceira, isla con presencia de *N. ceranae* pero no de *V. destructor*, mostró un perfil bacteriano diferente al resto de islas, mostrando una mayor abundancia de prácticamente todos los géneros a excepción de *Bartonella*, cuya abundancia en esta isla fue menor. Es necesario investigar en el futuro si estas diferencias se deben exclusivamente a la combinación de patógenos en esta isla o si está influenciada por otros factores como la ubicación geográfica, la diversidad floral o el clima, entre otros, puesto que la microbiota intestinal de las abejas puede variar en función de estos factores (Tola *et al.* 2020; Jabal-Uriel *et al.* 2022a; Gaggia *et al.* 2023).

No obstante, es llamativo que *Bartonella*, un género considerado no troncal, fuera el taxón más abundante en las islas Azores, mientras que *Gilliamella*, considerado como troncal, se encontró en una abundancia relativa muy baja. Esta diferencia contrasta con las observaciones en abejas adultas estudiadas en otras localizaciones del planeta, donde *Gilliamella* se encuentra en proporciones mucho más altas que las encontradas en este estudio (Powell *et al.* 2014; D'Alvise *et al.* 2018; Dong *et al.* 2020; Bleau *et al.* 2020; Castelli *et al.* 2021; Jabal-Uriel *et al.* 2022a). Este hecho, en el que *Bartonella* se encuentre en una abundancia relativa elevada y *Gilliamella* en una abundancia baja, se ha descrito en abejas de invierno de colonias monitorizadas durante 3 años en la parte occidental de Suiza (Kešnerová *et al.* 2020). Este estudio sugiere que esta

mayor abundancia de *Bartonella* podría estar relacionada con las diferencias en la alimentación, la edad o al comportamiento de las abejas durante el invierno.

Por otro lado, *Arsenophonus*, una bacteria endosimbionte facultativa identificada en colonias de abejas (Yañez *et al.* 2016; Drew *et al.* 2021; Nadal-Jimenez *et al.* 2022), se encontró en una abundancia relativa elevada en Flores (V+, N-) y Terceira (V-, N+). De hecho, en esta última, su abundancia fue mayor que otros géneros troncales como *Snodgrassella*, *Bifidobacterium* o *Bombilactobacillus*. *Arsenophonus* se ha identificado en las flores (McFrederick *et al.* 2017), en el polen corbicular, en el buche melario de las pecoreadoras (Corby-Harris, Maes y Anderson 2014), el pan de abeja (Donkersley *et al.* 2018) y en el intestino medio (Drew *et al.* 2021). Sin embargo, ha sido asociada con una mala salud en las abejas (Budge *et al.* 2016), mostrando una mayor abundancia en colonias afectadas por el colapso de las colonias (*Colony Collapse Disorder*, CCD) (Cornman *et al.* 2012). En abejorros, también hay evidencia de su posible implicación en su salud, ya que se ha descrito una mayor abundancia relativa de *Arsenophonus* en el cuerpo graso cuando estos se encuentran parasitados con *Apicystis bombi*, (Parmentier *et al.* 2018). Además, la presencia de esta bacteria también se ha asociado con *V. destructor*, ya que en ocasiones aparece como el género bacteriano predominante, observándose mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) en el ciego de las varroas (Pakwan *et al.* 2018). Por ello, se sugirió que el ácaro podría ser un posible vector biológico de *Arsenophonus*, pero hasta la fecha no se ha identificado ninguna correlación entre los niveles de enfermedad inducida por *Varroa* y *Arsenophonus* en las abejas melíferas (Hubert *et al.* 2016) y tampoco se conoce si es realmente es una bacteria patógena para *V. destructor*, para las abejas o para ambas (Hubert *et al.* 2016). Sin embargo, el hecho de que la isla donde esta bacteria registró la mayor abundancia de *Arsenophonus* (Terceira) sea una isla libre del ácaro, sumado a la ausencia de diferencias en su abundancia entre islas con y sin *Varroa*, parece contradecir la hipótesis de que *V. destructor* sea un transmisor de esta bacteria. No obstante, la isla de Santa María, que carece tanto del ácaro como de *N. ceranae*, es la isla que registró menor abundancia de *Arsenophonus*, lo que podría indicar que de alguna manera la presencia de otros patógenos podría influir en la abundancia de *Arsenophonus*.

Otra bacteria que ha sido asociada a *Varroa* es *Bartonella*, sugiriendo que el ácaro podría ser un reservorio de esta bacteria (Hubert *et al.* 2015), lo cual es consistente con nuestros resultados ya que *Bartonella* se encontró en una abundancia mayor en las islas donde *Varroa* está presente

Por el contrario, otros géneros como *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Frischella* y *Apilactobacillus* tuvieron una menor abundancia en las islas con el ácaro. Esto coincide en parte con lo observado por Hubert *et al.* (2017), aunque en este trabajo encontraron una mayor abundancia de *A. kunkkeii* en colonias con el ácaro. Otros estudios, sin embargo, no observaron diferencias en la microbiota entre abejas adultas de colonias con y sin *Varroa* (Kim, Kim y Park 2023) mientras que otros observaron mayores abundancias de Gammaproteobacterias (*Gilliamella* y *Frischella*), Betaproteobacterias (*Snodgrassella*), *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Marche *et al.* 2019) en abejas que emergieron con varroas. Sin embargo, las abejas de los estudios mencionados proceden de colonias que, con alta probabilidad, ya han estado expuestas a *V. destructor*, por lo que las posibles alteraciones en la microbiota intestinal podrían haberse producido anteriormente. Esto contrasta con las abejas de nuestro estudio, donde los estrictos controles de movimiento de colonias entre islas aseguran la existencia de poblaciones de abejas que nunca han estado expuestas al ácaro. Esta diferencia en la exposición al patógeno podría ser clave para explicar las variaciones observadas en la composición de la microbiota intestinal de las abejas.

Lo mismo sucede con *N. ceranae*, ya que estas mismas restricciones han posibilitado que existan colonias de abejas que no han estado expuestas al microsporidio. De hecho, desde el año 2008, según informes anuales de la autoridad veterinaria de las islas Azores que realiza encuestas para la detección de esporas de *Nosema* spp. mediante microscopía, revelaron que las únicas islas libres de microsporidios son Santa María y Flores. El análisis de Lopes *et al.* (2022) utilizó la misma técnica de PCR utilizada en estudio (ver **Metodología general**, Martín-Hernández *et al.* 2012) para identificar las especies de *Nosema*, confirmando que Santa María y Flores permanecen libres de *N. ceranae*, al menos hasta el año 2020. Al igual que con *V. destructor*, los estudios realizados en otras localizaciones (Powell *et al.* 2014; Hubert *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2019; Dong *et al.* 2020; Jabal-Uriel *et al.* 2022a) se han llevado a cabo en territorios

previamente invadidos por el microsporidio, por lo que la influencia de *N. ceranae* en la microbiota intestinal se ha producido con anterioridad.

En nuestro estudio, las islas con presencia de *N. ceranae* mostraron una mayor abundancia de *Lactobacillus* y una menor abundancia de *Bartonella*. Estos dos géneros también aparecen asociados a la infección natural con *N. ceranae*, aunque ambos aparecen en mayor abundancia en las abejas no infectadas (Jabal-Uriel *et al.* 2022a). Al excluir la isla de Terceira de los análisis, dado que mostró un perfil bacteriano diferente y podría influir en el análisis, se perdieron las diferencias en la abundancia de *Bartonella* pero se confirmó que la infección afecta principalmente al género *Lactobacillus*. Además, se observó que *Snodgrassella* presentó una mayor abundancia en las islas sin el microsporidio. En otros estudios que han analizado abejas infectadas naturalmente con *N. ceranae*, no se han encontrado diferencias en la microbiota intestinal (Hubert *et al.* 2017), o ha observado una mayor abundancia de *Bifidobacterium* en las abejas infectadas (Zhang *et al.* 2019). Además, Pico, isla que posee tanto *V. destructor* como *N. ceranae*, registró una mayor abundancia de géneros minoritarios a diferencia de Santa María, isla en la que estos dos parásitos no han estado nunca presentes. Esto podría indicar que la acción conjunta de ambos patógenos podría favorecer el incremento de bacterias atípicas del intestino de las abejas conduciendo a una disbiosis intestinal (Maes *et al.* 2016; Hubert *et al.* 2017). Una tendencia similar, aunque sin diferencias significativas, se observó en las colmenas infectadas con *N. ceranae* y *L. passim*. Es posible que, aumentando el número de muestras con combinaciones de estos parásitos, podría observarse una diferenciación más clara.

Sin embargo, al analizar las abejas en función de la presencia de *N. ceranae* a nivel de colmena en las islas donde está presente, las únicas bacterias que se encontraron en una abundancia mayor en las colmenas con el microsporidio fueron *Frischella* y *Gilliamella*. Esta última coincide con estudios de infecciones experimentales que indican que *Gilliamella* es una de las bacterias más afectadas por el microsporidio (Horton, Oliver y Newton 2015; Maes *et al.* 2016; Kakumanu *et al.* 2016; Raymann *et al.* 2018). Dado que en el **Capítulo IV** se detallan más a fondo las diferencias asociadas a la infección por *N. ceranae* en la microbiota intestinal de las abejas, en este capítulo no se profundiza en este aspecto.

En el caso de *L. passim*, al encontrarse distribuida por todo el archipiélago de las Azores, los análisis se realizaron considerando únicamente su presencia a nivel de colmena. Nuestro estudio reveló que las abejas procedentes de colmenas parasitadas presentaron una menor abundancia de *Frischella*, *Snodgrassella* y *Gilliamella*. Estas bacterias colonizan el íleon de las abejas, una de las regiones del intestino en la que, en infecciones experimentales, se ha observado que *L. passim* en su morfotipo haptomona forma una capa celular que recubre el epitelio intestinal a modo de biopelícula (Buendía-Abad *et al.* 2022a; de Paula *et al.* 2024). Dado que *L. passim* se ha detectado en las pupas, larvas, abejas recién emergidas, nodrizas y pecoreadoras, es decir, todas las fases del ciclo de vida de las abejas a excepción de la fase de huevo (Arismendi *et al.* 2022), es posible que la colonización del intestino de este parásito ocurra antes del establecimiento de la microbiota intestinal. En tal caso, la colonización temprana de *L. passim* podría interferir en el establecimiento de *Frischella* y alterar o desplazar la formación de la biopelícula entre *Gilliamella* y *Snodgrassella* en el íleon. Sin embargo, se desconoce si la carga parasitaria en las abejas infectadas de forma natural es suficiente para inducir la formación de la biopelícula de haptomonas que recubre el epitelio intestinal. Las dosis de células suministradas a las abejas en infecciones experimentales son muy elevadas y es posible que no corresponda con la realidad de lo que sucede en condiciones naturales en el campo.

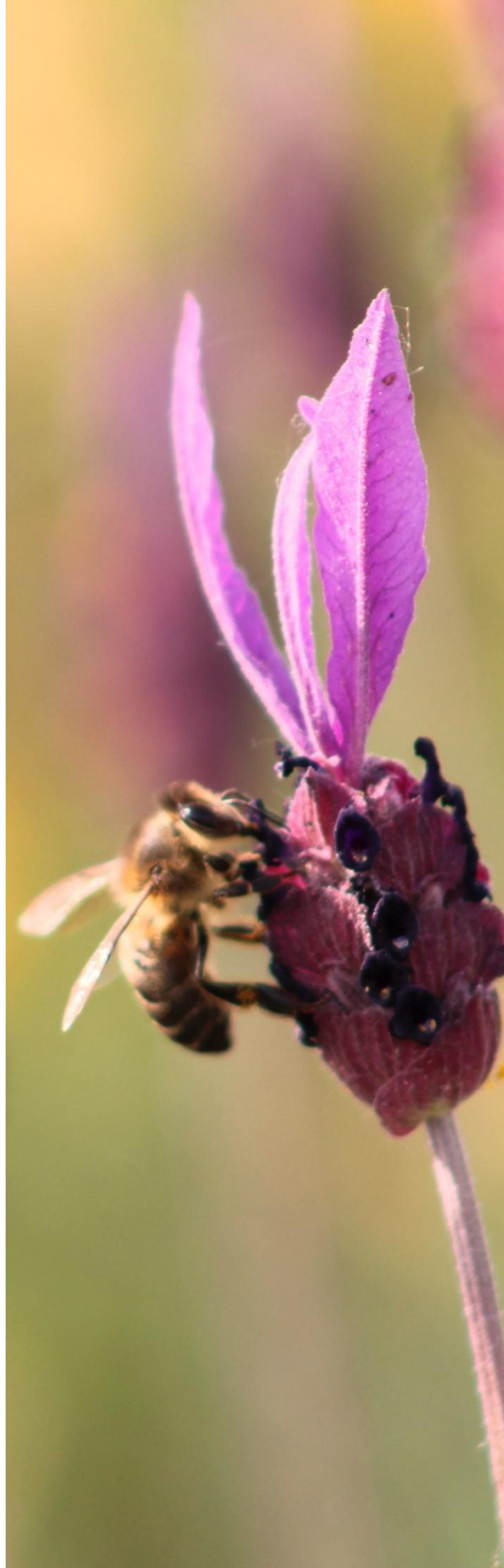
No existen muchos estudios en abejas que aborden la influencia de *L. passim* en la microbiota intestinal, y los que hay sugieren que este parásito no parece afectar a la microbiota intestinal de las abejas (Hubert *et al.* 2017; Liu *et al.* 2020). Se ha descrito que, cuando las abejas poseen una nutrición adecuada y una microbiota intestinal bien desarrollada son capaces de regular la parasitación por *L. passim*, mientras que cuando se encuentran en estado de disbiosis intestinal debido al estrés nutricional y social, pierden la capacidad de controlar el parásito (Schwarz, Moran y Evans 2016). Esto mismo se ha descrito en abejorros del género *Bombus* en relación con el tripanosomátido *C. bombi* (Cariveau *et al.* 2014; Mockler *et al.* 2018; Näpflin y Schmid-Hempel 2018; Blasco-Lavilla *et al.* 2023). De hecho, la presencia de *Lactobacillus* y *Gilliamella* como parte de la microbiota intestinal de los abejorros parece reducir la carga parasitaria de *C. bombi* (Mockler *et al.* 2018). Además, los ácidos producidos por *L. bombicola*, una especie bacteriana característica en abejorros, inhiben el

crecimiento *in vitro* de *C. bombi* (Palmer-Young, Raffel y McFrederick 2019), reforzando la hipótesis de que una microbiota bien establecida puede controlar la parasitación por tripanosomátidos en el intestino. No obstante, este aspecto aún requiere más investigación en abejas melíferas.

Este trabajo presenta, por primera vez, un estudio de la microbiota intestinal de las abejas antes de la expansión de dos de los patógenos de las abejas melíferas más ampliamente distribuidos a nivel mundial, mostrando que los principales géneros de la microbiota intestinal de las abejas se encuentran altamente conservados. Además, se ha observado que la presencia de *V. destructor*, así como de *N. ceranae* y *L. passim* influyen en la abundancia de algunos de esos géneros bacterianos. No obstante, se requiere de más estudio para comprender mejor las interacciones entre estos parásitos y las bacterias intestinales.

## CAPÍTULO IV

Influencia de la edad de infección experimental con *Nosema ceranae* en la microbiota intestinal de abejas obreras (*Apis mellifera iberiensis*)





## Influencia de la edad de infección experimental con *Nosema ceranae* en la microbiota intestinal de abejas obreras (*Apis mellifera iberiensis*)

En los últimos años, la microbiota intestinal de las abejas melíferas ha recibido especial atención debido al papel crucial que juega en su salud. Diversos factores pueden alterar esta microbiota, entre ellos se encuentra el microsporidio *N. ceranae*. En las abejas, la composición de la microbiota intestinal varía con la edad, hasta que las comunidades bacterianas se estabilizan a partir del séptimo día tras su emergencia, un proceso que parece coincidir con la infección del microsporidio. Sin embargo, no está del todo claro el impacto de la edad de infección en las comunidades bacterianas intestinales. Por ello, se infectaron experimentalmente a las abejas melíferas con un número constante de esporas de *N. ceranae* a distintas edades tras su emergencia y se analizaron las bacterias intestinales 7 días después de la infección mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), comparando los resultados con los de controles no infectados. Los resultados mostraron que las abejas infectadas presentaban una proporción y una carga significativamente mayores de *G. apicola*. Con respecto a la edad de la infección, las abejas infectadas justo después de la emergencia presentaban cargas elevadas de *G. apicola*, *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Ba. apis* y *Bo. apis*. Además, la carga de *G. apicola* era mayor en las abejas infectadas a casi todas las edades, mientras que las abejas no infectadas de más edad presentaban cargas más elevadas de *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Ba. apis* y *Bo. apis*. Estos resultados sugieren que la infección por *N. ceranae* y, en particular, la edad de las abejas en el momento de la infección modula la comunidad bacteriana intestinal, siendo *G. apicola* la especie más influenciada por la infección.

**Aguado-López, D.**, Urbietta Magro, A., Higes, M., Rodríguez, J. M., & Martín-Hernández, R. (2024). Influence of Age of Infection on the Gut Microbiota in Worker Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis*) Experimentally Infected with *Nosema ceranae*. *Microorganisms*, 12(4), 635.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms12040635>

Artículo científico publicado en “Microorganisms”

Publicado: 22 de marzo de 2024

## 1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal de las abejas melíferas desempeña muchas funciones cruciales en el hospedador: favorece la digestión de los alimentos (Kešnerová *et al.* 2017; Zheng *et al.* 2019; Li, Chenyi *et al.* 2022), mejora el desarrollo del hospedador (Zheng *et al.* 2017), modula el comportamiento (Jones *et al.* 2018), puede realizar funciones de degradación de los pesticidas (Wu *et al.* 2020) y microplásticos (Wang *et al.* 2021), mejora la respuesta inmunitaria y protege contra parásitos y patógenos (Engel, Martinson y Moran 2012; Schwarz, Moran y Evans 2016; Steele *et al.* 2021). Entre los diversos patógenos que infectan a las abejas melíferas, *N. ceranae* es uno de los más ampliamente distribuidos por todo el mundo (Higes *et al.* 2008c; Stevanovic *et al.* 2011; Yoshiyama y Kimura 2011; Martínez, Leal y Conget 2012; Guerrero-Molina *et al.* 2016; Wang *et al.* 2019). Este microsporidio es un parásito esporulado intracelular obligado que infecta las células del intestino medio, utilizando la maquinaria del hospedador para obtener los recursos que necesita para proliferar y, en última instancia, destruir las células epiteliales de este tejido (Dussaubat *et al.* 2012; Martín-Hernández *et al.* 2017). La infección por este microsporidio altera las funciones vitales de la abeja, causando estrés energético (Mayack y Naug 2009), perturbando la respuesta inmunitaria (Antúñez *et al.* 2009; Schwarz y Evans 2013; Martín-Hernández *et al.* 2017) y alterando el olfato, el aprendizaje, la orientación y la memoria (Gage *et al.* 2018), además de provocar trastornos digestivos. Asimismo, se produce un envejecimiento acelerado de las abejas (Ares *et al.* 2012) que interfiere en las tareas que éstas deben realizar en la colmena (Wolf *et al.* 2014), aumentando en última instancia la mortalidad a nivel individual y de colonia (Botías *et al.* 2013).

*N. ceranae* infecta principalmente a las abejas adultas, aunque también se ha observado en otras fases de desarrollo (Benvau y Nieh 2017; Urbieta-Magro *et al.* 2019a). De hecho, la susceptibilidad a la infección por microsporidios parece estar influida por la edad de las abejas. Los estudios de campo indican que las abejas dentro de la colonia pueden infectarse por primera vez a los 4-5 días tras su emergencia, dependiendo de la estación del año (Jabal-Uriel *et al.* 2022b), y que las abejas obreras más viejas tienen cargas parasitarias más altas (Smart y Sheppard 2012; Jack *et al.* 2016; Jabal-Uriel *et al.* 2022b). Además, se ha demostrado que tanto las reinas más jóvenes

(Chaimanee *et al.* 2014) como las obreras más jóvenes (Urbieta-Magro *et al.* 2019b), son más susceptibles a la infección por *N. ceranae* que las más viejas en infecciones experimentales de laboratorio. Dado que una de las diferencias entre las abejas más jóvenes y las más viejas es el establecimiento de la microbiota intestinal, esta podría explicar las diferencias en la susceptibilidad a la infección. De hecho, la infección por *N. ceranae* puede modificar la abundancia relativa de algunas especies bacterianas (Huang *et al.* 2018; Rubanov *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2019; Paris *et al.* 2020), ya que la alteración del epitelio intestinal puede afectar a la forma en que la microbiota intestinal se establece. Sin embargo, se desconoce la importancia de la edad a la que se infectan las abejas con *N. ceranae* en relación con la microbiota intestinal.

## 2. OBJETIVOS

Por lo indicado anteriormente, nos propusimos evaluar si la edad de las abejas cuando son infectadas experimentalmente con *N. ceranae* tiene efecto en las comunidades bacterianas intestinales.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Selección de las muestras

Las muestras utilizadas en este estudio fueron un subconjunto de abejas de un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación (Urbieta-Magro *et al.* 2019b) cuyo objetivo era determinar cómo afecta la edad de las abejas cuando son infectadas por *N. ceranae* en el desarrollo de la parasitación. En este estudio, las abejas se obtuvieron de cuadros de cría operculados de 5 colonias que no mostraban signos clínicos de ninguna enfermedad y se consideraron libres de *Nosema* spp. (confirmadas posteriormente por pruebas de PCR). Los cuadros se mantuvieron a 35°C en una incubadora para garantizar un suministro continuo de abejas melíferas recién emergidas y libres del microsporidio (Higes *et al.* 2007). Cada día, se recogían cuidadosamente abejas recién emergidas de los cuadros de cría y se depositaban de forma aleatoria en jaulas de red metálica hasta su infección (Martín-Hernández *et al.* 2011). De esta manera, todas las abejas de cada jaula tenían la misma edad. Estas abejas se alimentaron *ad libitum* con una solución de sacarosa que se preparaba diariamente (50% p/v en agua destilada), suplementada con un 2% de Promotor L® (Calier Lab. Lab., Les Franqueses

del Vallès, Spain), una mezcla comercial de vitaminas y aminoácidos (Higes *et al.* 2007; Martín-Hernández *et al.* 2011).

El día de la infección, antes de la inoculación, se retiró el alimentador de las jaulas durante 2 horas y, posteriormente, las abejas se anestesiaron con CO<sub>2</sub> durante 90 segundos, con el fin de facilitar su manipulación durante las infecciones experimentales. Cuando empezaban a despertarse, se les administró 2 µL de una solución con esporas de *N. ceranae* (57.000 esporas/µL) purificadas con Percoll® 95% (Higes *et al.* 2008b) extraídas de abejas infectadas de forma natural. Aunque en el ensayo llevado a cabo por Urbietta-Magro *et al.* (2019b) se infectaron abejas de edades de 0 a 15 días post-emergencia (p.e.), para este estudio únicamente se utilizaron aquellas edades en las cuales se disponían de controles no infectados de la misma edad a los que se les había inoculado con 2 µL de agua sin esporas con el fin de que pudieran ser comparados. De esta forma, las abejas analizadas en este trabajo tenían 0, 1, 4, 5, 8, 11, 13, y 14 días p.e. en el momento de la infección. Tanto las abejas infectadas como las no infectadas se mantuvieron en incubadoras del mismo modelo separadas y en las mismas condiciones (oscuridad, 33±1°C y 80% de humedad relativa) para evitar infecciones cruzadas.

A los 7 días post-infección (p.i.) las abejas supervivientes se sacrificaron para el análisis molecular. El abdomen de cada abeja se separó cuidadosamente del tórax en condiciones estériles para evitar la contaminación entre muestras, y la extracción de ADN se realizó individualmente utilizando el método de extracción TE como se describe en el **Capítulo I**. Se analizaron un total de 276 abdomenes de abejas: abejas infectadas (N=215) y no infectadas (N=61). La edad y el número de abejas utilizadas para analizar la microbiota intestinal se muestran en la **Tabla 22**. Se confirmó que todas las abejas del grupo infectado eran positivas a la infección por *N. ceranae* y las del grupo de control no estaban infectadas (Urbietta-Magro *et al.* 2019b).

Edad de infección (Días p.e.)	0	1	4	5	8	11	13	14	Total
Edad de análisis (Días p.e.)	7	8	11	12	15	18	20	21	
Abejas infectadas (N)	30	30	30	30	28	30	30	7	215
Abejas no infectadas (N)	11	10	6	6	10	6	6	6	61

**Tabla 22.** Número de abejas infectadas y no infectadas analizadas en cada cohorte de edad.

### 3.2. Análisis molecular

La abundancia absoluta (carga bacteriana) de las principales bacterias intestinales de las abejas melíferas (*F. perrara*, *G. apicola*, *S. alvi*, *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., and *Ba. apis*) se determinó mediante qPCR dirigida al gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña de los ribosomas (*ARNr 16S*) con cebadores previamente descritos (Kešnerová *et al.* 2017) y normalizada con respecto al gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (*COI*) del hospedador (*Apis mellifera*) (*Am-COI*) utilizando los cebadores previamente descritos (Martín-Hernández *et al.* 2012). La solución de esporas utilizada como inóculo para infectar a las abejas también se analizó para garantizar que se encontraba libre de bacterias intestinales y, de esta manera, no influir en los resultados.

Las reacciones de qPCR bacterianas y de *Am-COI* se llevaron a cabo por duplicado, utilizando *SYBR Green* como se describe en la **Metodología general**.

Dado que no existía ninguna técnica previamente descrita para la detección y cuantificación de *Bo. apis* (previamente denominada Alpha 2.2), se diseñó una pareja de cebadores y una sonda específicos. Para ello, se obtuvieron las secuencias del gen *ARNr 16S* de *Bo. apis*, así como las de *Parasaccharibacter apium* y *Saccharibacter floricola*, ambas reclasificadas recientemente como *Bo. apis* (Smith *et al.* 2021), a partir de la base de datos *GenBank* (NCBI). Posteriormente, las secuencias se alinearon utilizando la herramienta *ClustalW Multiple Alignment* del programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.6.1*. Se seleccionó un fragmento conservado de 151 pb presente en todas las secuencias disponibles y se analizó con el *software Primer Express 3.0.1* (Applied Biosystems Life Technologies Corp., Foster City, CA, Estados Unidos) para el diseño del cebador y la sonda. Se seleccionó el par de cebadores y la sonda más adecuados en función de los parámetros determinados por el *software*, que incluían la estabilidad, la longitud y el porcentaje de G/C. Tanto los cebadores como la sonda fueron proporcionados por Roche Diagnostics (Basilea, Suiza). La sonda elegida se modificó añadiendo ácidos nucleicos bloqueados (LNAs) para aumentar la temperatura de anillamiento (**Tabla 23**).

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño
ALPHA 2.2-F	CCGAGAGAGGGTTGTGGAATT	
ALPHA 2.2-R	AGATATTGGGAAGAACACCG	67 pb
ALPHA 2.2-P	6FAM-TGTAGA+GG+T+GAA+AT+TC-BHQ1	

**Tabla 23.** Cebadores y sonda para detectar y cuantificar el gen *ARNr 16S* de *Bo. apis*. F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); +: ácidos nucleicos bloqueados (LNAs).

En el caso de la qPCR de *Bo. apis*, las reacciones se realizaron por duplicado en un volumen final de 10 µL que contenía 5 µL de *LightCycler® 480 Probes Master Mix* (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), 0,3 µM de cada cebador, 0,1 µM de sonda y 1 µL de ADN muestra. Las condiciones de PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1 segundo a 72°C, más un paso final de enfriamiento de 30 segundos a 40°C.

Todas las muestras se analizaron individualmente y por duplicado como se describe en la **Metodología general**.

Para cuantificar la carga bacteriana, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos de doble cadena (*gBlock® Gene Fragment*, IDT, DNA Technologies; Coralville, IA, Estados Unidos) a partir de las secuencias de referencia del gen diana para cada una de las especies bacterianas analizadas (**Tabla 24**). Los ADN sintéticos se reconstituyeron siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron para elaborar curvas estándar basadas en diluciones seriadas con cantidades conocidas de ADN sintético que codificaba la secuencia diana. Así, cada valor de  $C_p$  se extrapola a la curva estándar correspondiente a cada bacteria, obteniendo la concentración en ng/µL, utilizando el *software* del termociclador.

Bacteria	Secuencia gBlock® Gene Fragment (5' to 3')	Tamaño
<i>Frischella perrara</i> ( <i>ARNr 16S</i> , NR_118490.1)	AGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGC TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAACCTGA TGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTTAAAGTACTITT CGGTGATGA <b>GGAAGTTATGTGTGGGATAAGC</b> ACATATAATTGACGTTAGT TACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA GGGTGCGAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCATGTAGCCG GATGATTAAGTTAGGTGTGAAAGCCT <b>CGGGCTCAACCTGAGAATAG</b> CATT TAAAACTGGTGATCTGGAGTACTGTAGAGGGAGGTAGAATTCCACGTGTA CGGTTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG	490 pb



<p><i>Bartonella apis</i> (ARNr 16S, NR_126253.1)</p>	<p>AAGCCAAAATCAAATTTTCAACTTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAA CGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCACITTTTCGGAGTGA GTGGCAGACGGGTGAGTAACGC<b>GTGGGAATCTACCTATTTCTACG</b>GAAT AACGCAGAGAAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCITTCGGGAGAAAAGAT TTATCG<b>GAGATAGATGAGCCCCGCTT</b>GGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA TGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA CATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGCTGAGTGAT GAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTA ACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAA</p>	<p>471 pb</p>
<p><i>Bombella apis</i> (ARNr 16S, NR_147774.1)</p>	<p>AAGATGATGACGGTACCTAGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGC AGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGT AAAGGGCGCGTAGGCTGTCTGTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTA ACCTGGGAACTGCATTTGATACGTGCAGACTAGAGT<b>CCGAGAGAGGGTTG</b> <b>TGGAATT</b>CCCAG<b>TGTAGAGGTGAAATTC</b>GT<b>AGATAATTGGGAAGAACACC</b> <b>GGTTGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCGGAACTGACGCTGAGGCGCGAAAAG</b> <b>CGTGGGGAGCGAACAGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG</b> <b>ATGTGTGCTGGATGTTGGGTGATTTTATCATTCACTGTCGGAGCTAACGC</b> <b>GTTAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTGAAACTCAAAGG</b> <b>AATGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC</b></p>	<p>490 pb</p>
<p><i>Apis mellifera</i> (Am- COI, OM203346.1)</p>	<p>GTTATACCATTTTTAATTGGAGGATTTGGAAATTTGGCTTATTCCTTTAATA CTAGGATCACCTGATATAGCATTCCTCCCGAATAAATAATATTAGATTTTGA TTACTTCCCTCCCTCATTATTTATACCTTTTATTAAGAAAATTTATTTTA<b>TCCAAG</b> <b>ACCAGGAACCTGGAT</b>GAACAGTATATCCACCATTATCAGCATAATTTATATCA TTCTTCACCTTCAGTAGATTTTGCATTT<b>TTTTCTCTTCATATATCAGGAAT</b> <b>TTCC</b>TCAATTTATAGGATCATTAACCTTAATAGTTACAATTATAATAATAAAA AAATTTTTCTATAAAATTATGACCAAATTTTCATTAATTTCCATGATCAGTTTTT ATTACAGCAATTTTATTAATTTATATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCAATTA CTATACTATTATTGATCGAAAATTTTAATACATCATTTTTCGATCCTATAGG AGGTGGAGATCCAATTCITTTATCAACATTTA</p>	<p>495 pb</p>

**Tabla 24.** El fragmento genético *gBlock*® para el gen *ARNr 16S* bacteriano y el gen *COI* de *Apis mellifera*. Las secuencias de los cebadores (rojo) y las sondas (azul) se indican en negrita y subrayadas.

A continuación, se realizó la conversión al número de copias del ADN sintético que se calculó a partir de su peso molecular y de la concentración de ADN en la solución. Para generar las curvas estándar se utilizaron diluciones que contenían entre 2 y  $10^8$  copias de ADN sintético por  $\mu\text{L}$ . El límite de detección (LD) para cada bacteria se fijó en función del último valor  $C_p$  (menor concentración de ADN) que generó una señal de amplificación (**Tabla 25**).

Aquellas muestras en las que el número de copias de ADN de cualquier especie bacteriana se encontraban por debajo del LD, se consideraron demasiado bajas para ser cuantificadas y, por lo tanto, se consideraron negativas y se asignó el valor de 0 copias. La eficacia de los cebadores (E) se estimó a partir de la pendiente de la ecuación,  $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$ , y las

características de los cebadores y su rendimiento se resumen en la **Tabla 25**. Posteriormente, las cargas bacterianas se normalizaron en función del número de copias del gen *Am-COI*, que se evaluaron con diluciones de ADN *Am-COI* sintético que contenían entre  $10^2$  y  $10^8$  copias. Las muestras en las que el valor del número de copias del *Am-COI* fue negativo o inferior a  $10^5$  copias se excluyeron del análisis, ya que se consideró que el ADN extraído no tenía la calidad suficiente.

Especie	Secuencia (5' to 3')	Tamaño	T <sub>m</sub> (°C)	Curvas estándar	
				Eficiencia (%)	LD Cp (copias)
<i>Frichella perrara</i>	F: GGAAGTTATGTGTGGGATAAGC R: CTATTCTCAGGTTGAGCCCG	185 pb	84.4	1,937 (96.85)	35,75 ( $10^2$ )
<i>Gilliamella apicola</i>	F: CTTTGTGGCCATCGGTTAGGCC R: CCGCTTGCTCTCGCGAGG	160 pb	83.6	2,032 (101.6)	39,06 ( $10^2$ )
<i>Snodgrassella alvi</i>	F: CTTAGAGATAGGAGAGTGCCTT R: AACTTAATGATGGCAACTAATGACAA	132 pb	84.6	1,926 (96.3)	38,43 ( $10^2$ )
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	F: ATGCAAGTCGAACGGGATCC R: CATCCCATGCCGGTAAACCC	174 pb	85.8	2,013 (100.6)	36,94 (10)
<i>Bombilactobacillus</i> spp.	F: AGTCGAGCGCGGGAAGTCA R: AGCCGTCTTTCAACCAGCACT	169 pb	84.5	2,043 (102.1)	36,4 (10)
<i>Lactobacillus</i> spp.	F: GCAACCTGCCCTWTAGCTTG R: GCCCATCCTKTAGTGACAGC	118 pb	81.3	1,964 (98.2)	39,52 (10)
<i>Bartonella apis</i>	F: GTGGGAATCTACCTATTTCTACG R: AACGCGGGCTCATCTATCTC	103 pb	76.6	2,016 (100.8)	37,78 (10)
<i>Bombella apis</i>	F: CCGAGAGAGGGTTGTGGAATT R: AGATATTTGGGAAGAACACCG P: TGTAGA+GG+T+GAA+AT+TC	65 pb	-	2,057 (102.8)	38,5 (2)
<i>Apis mellifera</i>	F: TCCAAGACCAGGAAGTGGAT R: TTTTCTCTTCATATATCAGGAAATTTCC	112 pb	75.2	1,953 (97.7)	34,87 ( $10^5$ )

**Tabla 25.** Cebadores utilizados y características de las curvas estándar. LD: límite de detección de los conjuntos de cebadores, expresado como el número más bajo de copias de ADN detectadas cuando se realizaron curvas estándar; Cp: *crossing point* (punto de cruce); F: *forward* (directo); R: *reverse* (reverso); P: *probe* (sonda); pb: pares de bases; T<sub>m</sub>: *Melting temperature* (Temperatura de fusión).

La normalización con el gen *Am-COI* se realizó con el fin de ajustar las posibles variaciones en el tamaño del abdomen y el intestino y de la eficiencia de la extracción de ADN entre las muestras. El número de copias del gen *ARNr 16S* de cada bacteria se determinó como se ha descrito previamente (Kešnerová *et al.* 2017). El número de copias en bruto del gen *ARNr 16S* ( $n_1$ ) se normalizó dividiéndolo por el número de copias del gen *Am-COI* presentes en la muestra ( $n_{COI}$ ). A continuación, se multiplicó por la mediana del número de copias del gen *Am-COI* de todas las muestras y el volumen total del ADN

extraído (es decir, 100  $\mu$ L) para obtener los números de copias normalizados por abdomen ( $n_{abs}$ ). El cálculo se resume en la siguiente fórmula:  $n_{abs} = (n_1/n_{COI}) \times \text{mediana}(n_{COI}) \times 100$ .

Tras la normalización, los datos se convirtieron a escala logarítmica para el análisis estadístico y todos los valores considerados como 0 copias se sustituyeron por 1 para las transformaciones logarítmicas.

### 3.3. Análisis estadísticos

Para determinar si la infección por *N. ceranae* tuvo algún efecto en la presencia de algún grupo bacteriano, se realizó un análisis para cada especie bacteriana analizada mediante la prueba de chi-cuadrado con corrección de Yates. Además, se comparó la carga bacteriana de cada especie analizada entre las abejas infectadas y no infectadas mediante un ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Games-Howell. Para evaluar si la edad de infección con *N. ceranae* producía diferencias en la carga de cualquier grupo bacteriano, se compararon las cargas bacterianas de las abejas infectadas y no infectadas mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Todos los análisis se realizaron con el programa IBM® SPSS® *Statistics* 25.0 y se consideraron como estadísticamente significativos los valores de  $p < 0,05$ .

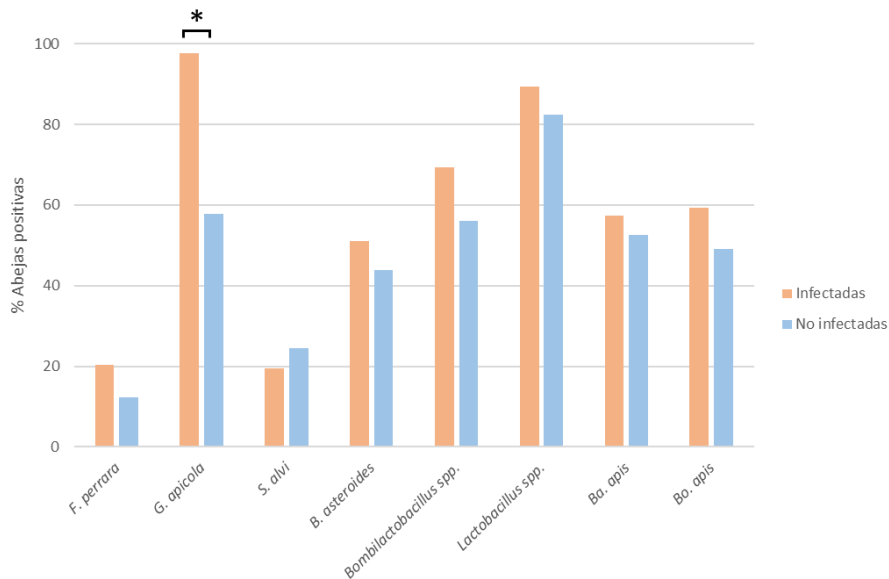
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Influencia de la infección por *N. ceranae* en las bacterias intestinales de las abejas melíferas

La solución de esporas utilizada para infectar a las abejas fue negativa para todas las especies bacterianas evaluadas en este estudio, lo que indica que las abejas infectadas no fueron inoculadas con bacterias intestinales. Para determinar si las especies de bacterias intestinales y su carga diferían en las abejas infectadas y no infectadas, se excluyeron del análisis 13 muestras (9 abejas infectadas y 4 no infectadas) de las 276 disponibles debido a la falta de amplificación o porque estaban por debajo del LD del *Am-COI* establecido.

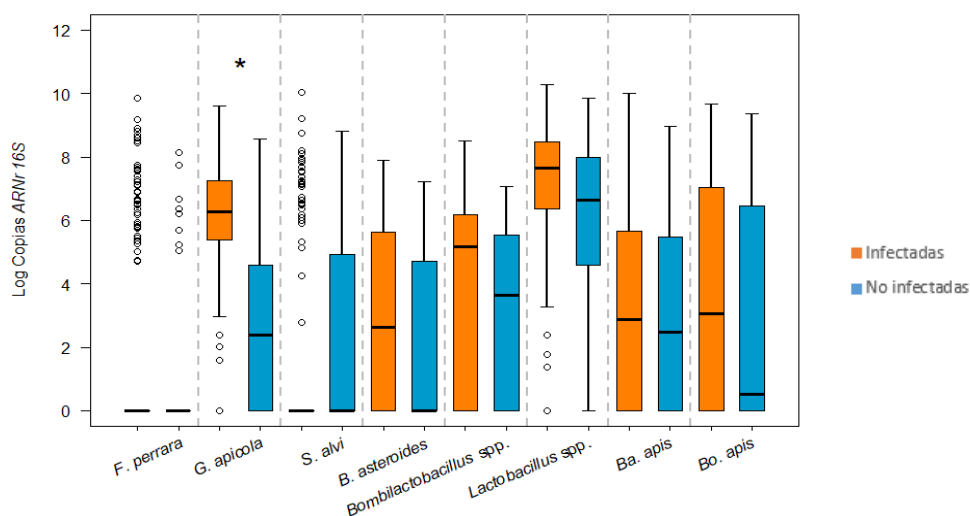
La proporción de abejas infectadas y no infectadas positivas para cada bacteria analizada se muestra en la **Figura 40**. Las abejas infectadas registraron

una mayor proporción de casi todas las especies bacterianas con respecto a las no infectadas. Sin embargo, sólo *G. apicola* se encontraba en una proporción significativamente mayor de abejas infectadas ( $X^2=67,658$ ;  $p<0,0001$ ). En todas las demás especies bacterianas, las proporciones no difirieron significativamente entre los grupos: *F. perrara* ( $X^2=1,44$ ;  $p=0,230$ ), *S. alvi* ( $X^2=0,13$ ;  $p=0,716$ ), *B. asteroides* ( $X^2=0,641$ ;  $p=0,423$ ), *Bombilactobacillus* spp. ( $X^2=2,964$ ;  $p=0,085$ ), *Lactobacillus* spp. ( $X^2=1,38$ ;  $p=0,240$ ), *Ba. apis* ( $X^2=0,226$ ;  $p=0,634$ ) y *Bo. apis* ( $X^2=1,469$ ;  $p=0,225$ ).



**Figura 40.** Porcentaje (%) de abejas positivas a cada especie bacteriana en abejas infectadas (naranja) y no infectadas (azul) independientemente de su edad. \* $p<0,05$ .

Con respecto a la abundancia absoluta de cada bacteria intestinal, únicamente *G. apicola* se encontró en una carga significativamente mayor en las abejas infectadas (Games-Howell,  $p=0,0001$ ; **Figura 41**). Para el resto de las especies bacterianas, su abundancia fue mayor en las abejas infectadas, excepto en el caso de *S. alvi*, aunque sin diferencias significativas entre abejas infectadas y no infectadas.



**Figura 41.** Abundancia absoluta del gen *ARNr 16S* para las diferentes bacterias intestinales analizadas en abejas infectadas (naranja) y no infectadas (azul). Cuando la distribución de las muestras no permite establecer cajas, los valores se representan mediante círculos. \* $p < 0.05$ .

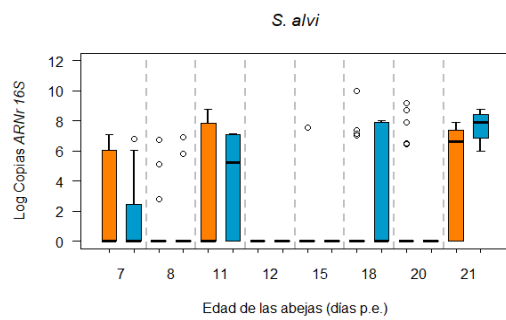
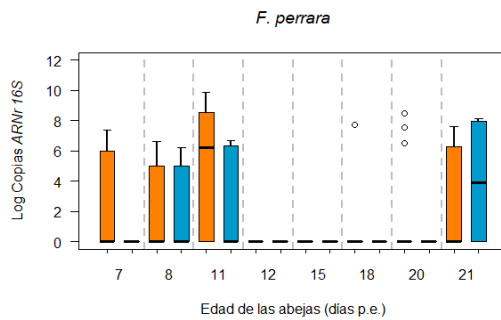
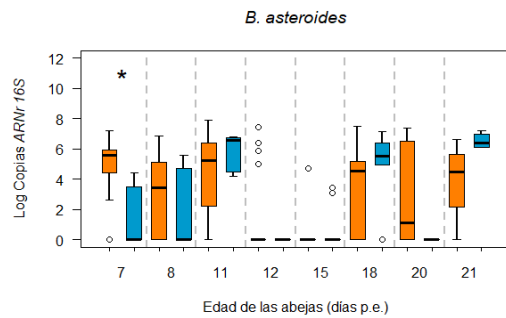
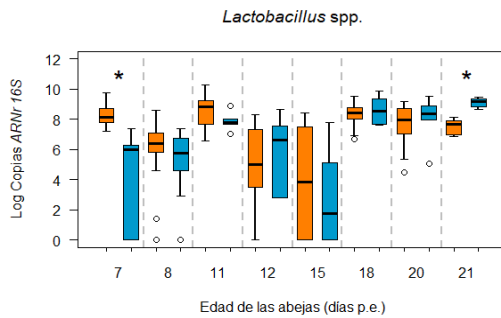
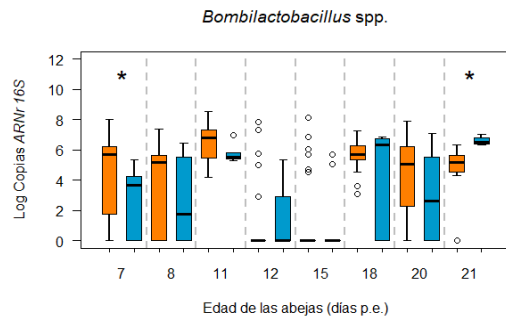
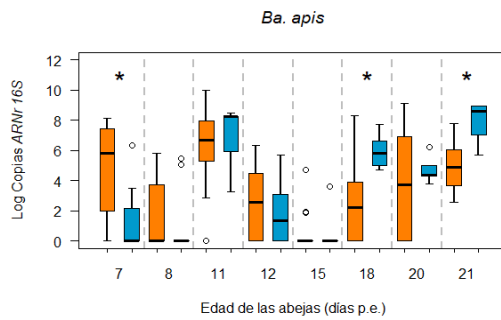
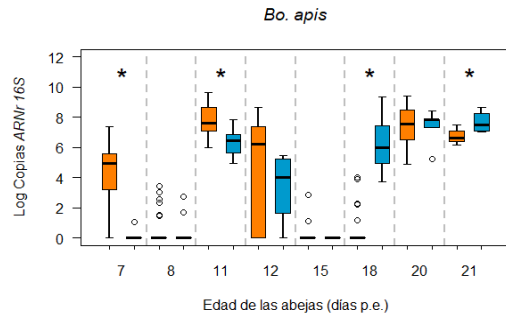
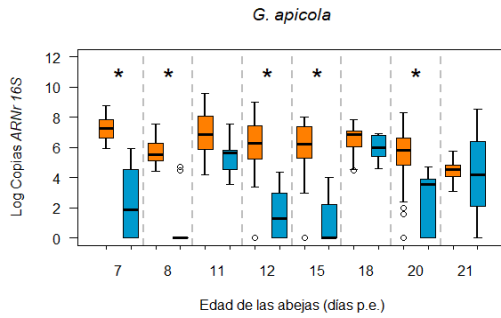
#### 4.2. Cargas bacterianas en abejas melíferas infectadas y no infectadas de la misma edad

De las 276 abejas analizadas, en 13 no se obtuvo amplificación del gen *Am-COI*, por lo que fueron excluidas del análisis posterior y, en la **Tabla 26**, se muestra el número total de abejas melíferas analizadas en cada cohorte de edad. Cuando se compararon las cargas bacterianas entre abejas infectadas y no infectadas de la misma edad, se observaron algunas diferencias (**Figura 42**). *G. apicola* fue la única especie para la que se detectó una carga bacteriana significativamente más elevada en las abejas infectadas a casi todas las edades (7, 8, 12, 15 y 20 días p.e.) respecto a las abejas no infectadas (Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ;  $p=0,001$ ;  $p=0,0001$ ;  $p=0,006$ , respectivamente).

Edad de infección (Días p.e.)	0	1	4	5	8	11	13	14	Total
Edad de análisis (Días p.e.)	7	8	11	12	15	18	20	21	
Abejas infectadas (N)	28	30	27	27	27	30	30	7	206
Abejas infectadas (N)	11	10	5	6	10	6	5	4	57

**Tabla 26.** Número de abejas incluidas en los análisis estadísticos.

■ Infeccionadas  
■ No infectadas

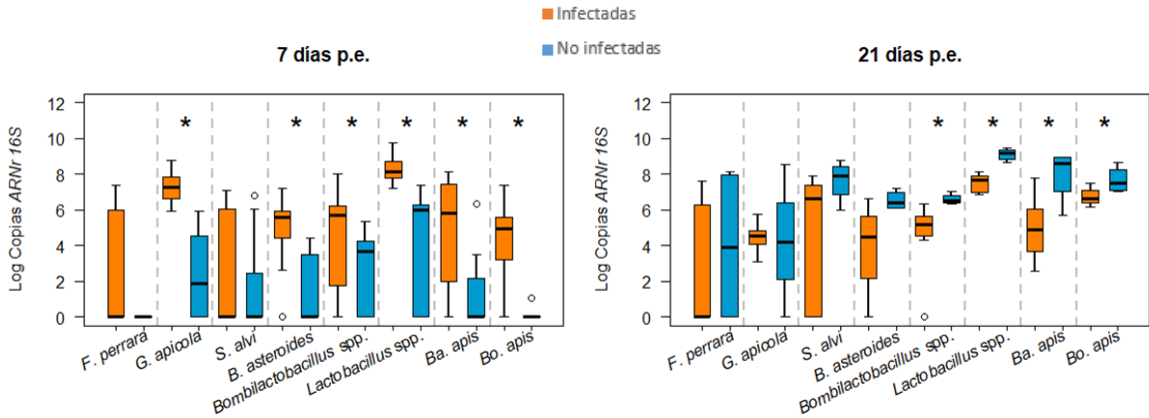


**Figura 42.** Diagramas de cajas que muestran la abundancia absoluta del número de copias del gen *ARNr 16S* para las diferentes bacterias intestinales analizadas en abejas infectadas por *N. ceranae* (naranja) y no infectadas (azul) a cada edad, ordenadas de mayores a menores diferencias. Cuando la distribución de las muestras no permite establecer casillas, las bacterias se representan mediante círculos. \* $p < 0.05$ .

La carga bacteriana de *Bo. apis* fue significativamente mayor a los 7 (Mann-Whitney,  $p=0,007$ ) y 11 días p.e. en las abejas infectadas (Mann-Whitney,  $p=0,01$ ), pero a partir de los 18 días p.e., la carga de *Bo. apis* fue significativamente mayor en las abejas no infectadas de esta edad (Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ) y a los 21 días p.e. (Mann-Whitney,  $p=0,007$ ). Lo mismo ocurrió con *Ba. apis*, que fue significativamente más abundante a los 7 días p.e. en las abejas infectadas (Mann-Whitney,  $p=0,02$ ) y en las no infectadas a los 18 y 21 días p.e. (Mann-Whitney,  $p=0,001$ ;  $p=0,02$ , respectivamente). La misma tendencia fue evidente para *Bombilactobacillus* spp. y *Lactobacillus* spp., con cargas bacterianas significativamente más altas en las abejas infectadas más jóvenes (Mann-Whitney,  $p=0,018$ ;  $p=0,0001$ , respectivamente) y no infectadas más viejas (Mann-Whitney,  $p=0,01$ ;  $p=0,006$ , respectivamente). No se observaron diferencias significativas en las cargas bacterianas de *F. perrara* y *S. alvi* entre abejas infectadas y no infectadas en ninguna de las edades analizadas.

La mayor diferencia entre abejas infectadas y no infectadas se observó en las abejas más jóvenes y viejas que recibieron la infección. De hecho, en aquellas que se infectaron poco después de la emergencia (7 días de edad en el momento del análisis) presentaron cargas bacterianas más altas que las abejas no infectadas, con diferencias significativas para *G. apícola* (Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ), *B. asteroides* (Mann-Whitney,  $p = 0,0001$ ), *Bombilactobacillus* spp. (Mann-Whitney,  $p=0,018$ ), *Lactobacillus* spp. ( $p=0,0001$ ), *Ba. apis* (Mann-Whitney,  $p=0,003$ ) y *Bo. apis* (Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ; **Figura 43**).

Por el contrario, las abejas con mayor edad que recibieron la infección (21 días de edad en el momento del análisis) presentaron cargas significativamente menores de *Ba. apis* (Mann-Whitney,  $p=0,02$ ), *Bo. apis* (Mann-Whitney,  $p=0,007$ ), *Bombilactobacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. (valores de  $p$  ya mencionados) que las abejas infectadas de la misma edad (**Figura 43**). Sin embargo, el número de abejas no infectadas de este grupo era muy bajo ( $n=4$ ).



**Figura 43.** Abundancia absoluta del número de copias del gen *ARNr 16S* de las distintas bacterias intestinales analizadas en abejas de 7 días (izquierda) y 21 días (derecha) infectadas con *N. ceranae* y no infectadas. Cuando la distribución de las muestras no permite establecer cajas, las bacterias se representan mediante círculos: \*  $p < 0.05$ .

En cuanto al resto de las edades (8-20 días p.e.), aparte de *G. apicola*, como ya se ha descrito previamente que fue la bacteria más significativamente influida por la infección, la carga bacteriana entre abejas infectadas y no infectadas sólo fue significativamente diferente para *Bo. apis* a los 11 y 18 días p.e. (Mann-Whitney,  $p=0,01$ ;  $p=0,0001$ , respectivamente) y *Ba. apis* a los 18 días p.e. (Mann-Whitney,  $p=0,001$ ). Sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas para los demás días, la carga bacteriana media en las abejas infectadas con *N. ceranae* fue superior a la de las no infectadas, principalmente en las abejas con 8 y 11 días de edad.

## 5. DISCUSIÓN

Este trabajo se diseñó para determinar si la infección experimental con *N. ceranae* y la edad a la que las abejas se infectan con el microsporidio influye en su microbiota intestinal. Por ello, estudiamos los principales taxones bacterianos que representan el 95-99% del bacterioma intestinal de las abejas melíferas, demostrando que, de todas las especies analizadas, *G. apicola* fue la especie más significativamente alterada por la infección del microsporidio, encontrándose aumentada tanto en términos de presencia como de carga bacteriana. Esta asociación positiva entre *G. apicola* y la infección experimental por *N. ceranae* parece ser un efecto consistente en la infección, ya que también se ha descrito por otros autores (Rubanov *et al.* 2019; Paris *et al.* 2020; Castelli

*et al.* 2020; Zhang *et al.* 2021; Lau *et al.* 2024) en ensayos realizados en condiciones muy diferentes y diversas, incluyendo la infección a diferentes edades, diferentes subespecies de abejas melíferas, distintas dosis de esporas, regiones intestinales examinadas, dietas suministradas, métodos analíticos, o mediante el análisis de abejas individuales o de muestras colectivas. Sin embargo, otros estudios no encontraron ninguna asociación entre la infección por *N. ceranae* y esta bacteria ni con cualquier otra (Li *et al.* 2017), mientras que en otros se encontraron asociaciones con otras bacterias como las de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Snodgrassella* o *Bartonella* (Smith y Newton 2020; Castelli *et al.* 2020; Panjad *et al.* 2021; Naree *et al.* 2022), que no se vieron modificadas en este estudio. Hasta el momento de este trabajo, ningún estudio había abordado el efecto de la edad en la relación entre microbiota e infección, e incluso este factor no suele tenerse en cuenta a la hora de comparar resultados entre estudios. No obstante, nuestro trabajo demuestra que es importante tener en cuenta este factor, ya que los resultados varían en función de la edad a la que se produce la infección.

De hecho, se observaron diferencias significativas entre las abejas infectadas y las no infectadas en dos momentos clave, que coincidieron con las abejas más jóvenes y las más viejas del ensayo. Así, las abejas infectadas justo después de la emergencia presentaban cargas bacterianas significativamente más elevadas para todos los taxones analizados, excepto para *F. perrara* y *S. alvi*, mientras que había una mayor abundancia de *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Ba. apis* y *Bo. apis* en las abejas no infectadas de 21 días de edad.

Cabe señalar que en el trabajo inicial del que procedían las abejas de la presente investigación (Urbietta-Magro *et al.* 2019b), todas las abejas infectadas fueron positivas para *N. ceranae*; siendo las que tenían 7 y 8 días de edad (infectadas en los días 0 y 1 p.e.) mucho más susceptibles a la infección por el microsporidio. Esto puede deberse a que las abejas recién emergidas no tienen las membranas peritróficas bien desarrolladas (de Oliveira *et al.* 2023) y la ausencia de esta barrera física puede favorecer la infección de las células epiteliales del ventrículo. Aunque, en nuestro estudio, las abejas de 8 días de edad no mostraron diferencias significativas en las cargas bacterianas, la tendencia fue similar a la del día anterior.

Lo mismo ocurrió con las abejas no infectadas de 21 días de edad, las cuales mostraron una mayor carga de algunas bacterias mientras que, en las abejas de 18 y 20 días de edad, ya mostraban una tendencia hacia una mayor carga bacteriana, aunque sin mostrar diferencias significativas con las abejas infectadas.

Por lo tanto, la infección por *N. ceranae* aparentemente altera las bacterias intestinales (en un sentido u otro dependiendo de la edad de infección), posiblemente debido al daño en el epitelio del intestino medio y a las alteraciones digestivas derivadas de esta lesión. Es posible que aumentando el número de abejas a analizar (principalmente en el grupo de abejas no infectadas) podría producir resultados más robustos y una diferenciación más clara.

Como se ha comentado, *G. apicola* fue la especie más fuertemente influenciada por la infección por *N. ceranae*. Su prevalencia y abundancia incrementada en el intestino de las abejas melíferas se ha asociado con disbiosis intestinal y deficiencias en el hospedador (Maes *et al.* 2016; Rubanov *et al.* 2019). El aumento de esta especie y de otras consideradas no troncales parece desplazar el establecimiento de otras bacterias intestinales troncales como *S. alvi* (Ludvigsen *et al.* 2015; Maes *et al.* 2016), reduciendo la función protectora de la biopelícula que estas dos especies forman en el íleon, lo cual, a su vez, ha sido fuertemente asociado con un desarrollo deficiente del hospedador y una mortalidad temprana. De hecho, *S. alvi* aparece con una baja frecuencia en nuestra investigación, lo que concuerda con lo anteriormente mencionado al encontrar una mayor prevalencia de *G. apicola*. Por lo tanto, el aumento de esta especie podría ser un marcador de disbiosis intestinal, como se ha sugerido previamente (Maes *et al.* 2016).

Por otro lado, se ha descrito previamente que las lesiones producidas por *N. ceranae* en el ventrículo a los 7 días después de la infección incluyen signos de degeneración en la mayoría de las células epiteliales (Higes *et al.* 2007; Dussaubat *et al.* 2012), lo que podría afectar a la funcionalidad del intestino medio y perjudicar la digestión de alimentos y la absorción de nutrientes (Crailsheim 1988; 1990; Gillott 1995). Por lo tanto, la glucosa y fructosa, procedentes de la hidrólisis de la sacarosa del alimento por una sacarasa secretada por las glándulas hipofaríngeas (Terra, Ferreira y Baker 1996; Hu *et*

*al.* 2019), no serían correctamente absorbidas por el epitelio dañado del ventrículo y pasarían al íleon y al recto. Esto también podría ocurrir en el caso de los aminoácidos y vitaminas, que serían utilizados por las bacterias intestinales como sustrato (Lee *et al.* 2018; Callegari *et al.* 2021), produciendo un posible desequilibrio adicional en la microbiota intestinal.

Además, otros efectos previamente descritos de la infección por *N. ceranae* podrían contribuir a la disrupción de la homeostasis del tracto digestivo, como la alteración en la regulación de los sistemas antioxidantes, que disminuye la producción de especies reactivas del oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS) (Dussaubat *et al.* 2012; Vidau *et al.* 2014; Paris *et al.* 2017), o potenciando la inmunosupresión al inhibir la producción de péptidos antimicrobianos (*Antimicrobial peptides*, AMPs) (Antúnez *et al.* 2009; Li *et al.* 2017; Aufauvre *et al.* 2014). De hecho, la infección por microsporidios en otros insectos induce la acidificación y el aumento de ROS en el intestino posterior, reduciendo la diversidad bacteriana intestinal y afectando la estructura de la microbiota intestinal (Tan *et al.* 2015). Por lo tanto, al alterar el ecosistema intestinal, también a través de cambios en los AMPs, ROS o el pH, *N. ceranae* podría influir en las comunidades bacterianas. Aquí, todos estos desequilibrios producen un aumento o una disminución en la abundancia de las especies bacterianas. De esta manera, la no absorción de azúcares y aminoácidos en el intestino medio y su paso al íleon podría explicar el motivo por el que las abejas infectadas tienen una mayor abundancia bacteriana. Además, *G. apicola* es una de las primeras bacterias que colonizan el íleon y puede utilizar la glucosa y la fructosa simultáneamente como sustratos (Zheng *et al.* 2016), poseyendo además rutas metabólicas completas para la utilización de todos los aminoácidos (Alberoni, Di Gioia y Baffoni 2023). Como resultado, esta especie se beneficiaría del flujo de estos nutrientes, lo que explica por qué es la especie más influenciada por la infección del microsporidio en este estudio.

El trabajo que aquí se presenta muestra que la edad a la que se infectan las abejas con *N. ceranae* tiene especial relevancia en el bacterioma intestinal. Las abejas infectadas dentro de las 24 horas tras su emergencia reciben el microsporidio y la microbiota intestinal prácticamente al mismo tiempo. Por el contrario, todas las demás abejas ya tenían, en cierta medida, bacterias en su tracto digestivo en el momento de la infección y la estabilidad de estas bacterias depende de la edad, como ya se mencionó anteriormente en el **apartado 3.5**.

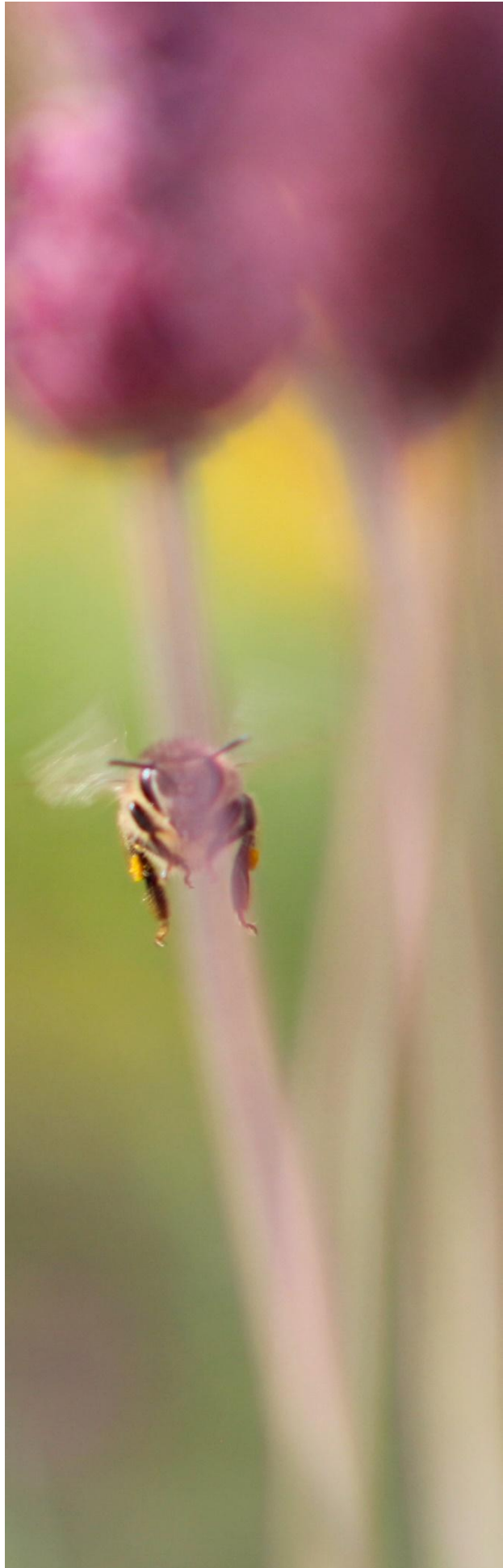
**de Revisión Bibliográfica.** De hecho, las abejas infectadas a las 24 horas p.e. aún no tienen la microbiota establecida, mientras que las infectadas a los 14 días p.e. sí la tienen (Martinson, Moy y Moran 2012; Powell *et al.* 2014).

Sin embargo, estos resultados se obtuvieron en condiciones de laboratorio y, evidentemente, podrían diferir en condiciones de campo. De hecho, las abejas se infectan de forma natural a partir de los 4-5 días p.e. dentro de la colmena (Jabal-Uriel *et al.* 2022b). Por otro lado, en los estudios llevados a cabo en condiciones de campo, hay menos disparidad en la microbiota intestinal de las abejas melíferas en relación con la infección. Los efectos reportados varían desde ninguna diferencia entre abejas infectadas y no infectadas (Hubert *et al.* 2017) hasta una mayor abundancia de bifidobacterias en abejas infectadas por *N. ceranae* (Zhang *et al.* 2019) o de *Bartonella* en abejas melíferas no infectadas comparadas con las altamente infectadas (Jabal-Uriel *et al.* 2022a). Las abejas de estos estudios desarrollaron parte de su vida en el interior de la colmena, lo que les permitió adquirir de manera natural su microbiota intestinal característica. Como se menciona en el **apartado 3.3 de la Revisión Bibliográfica**, hay múltiples vías por las que va adquiriendo y desarrollando su microbiota desde que emerge, que, por supuesto, están limitados en los ensayos de laboratorio. Por lo tanto, es plausible que la microbiota haya comenzado a establecerse cuando las abejas se infectan naturalmente y, consecuentemente, la susceptibilidad a la infección puede diferir de la de las abejas infectadas experimentalmente y mantenidas en el laboratorio durante todo el ensayo.

No obstante, la mayoría de las abejas de nuestro estudio poseían los principales taxones bacterianos en el intestino, a pesar de no haber desarrollado su ciclo de vida natural dentro de la colmena tras su emergencia. La adquisición de las bacterias, por tanto, se realizó a través del contacto con el cuadro de cría en las primeras 24 horas después de la emergencia, siendo *S. alvi* una notable excepción. Además, se tuvo especial cuidado en asegurar que el inóculo de esporas de *N. ceranae* no proporcionara bacterias intestinales a las abejas del grupo infectado. De hecho, el análisis por qPCR reveló que en dicho inóculo no se detectó la presencia de ninguna especie analizada en este estudio. En otras palabras, las bacterias detectadas en este estudio sólo pudieron ser adquiridas a través del contacto con el cuadro de cría. Estos resultados indican que la emergencia natural y la breve exposición al marco de cría es suficiente

para adquirir una microbiota intestinal muy similar a la encontrada en el entorno de la colmena, como previamente se ha descrito (Powell *et al.* 2014; Anderson *et al.* 2023).

# DISCUSIÓN GENERAL





Las bacterias intestinales de las abejas melíferas desempeñan funciones esenciales en el mantenimiento de su salud, entre las que destacan la digestión de componentes del alimento (Kešnerová *et al.* 2017; Zheng *et al.* 2019; Li, Chenyi *et al.* 2022) y la protección frente a parásitos y patógenos (Engel, Martinson y Moran 2012; Schwarz, Moran y Evans 2016; Steele *et al.* 2021). Además, potencian el desarrollo del hospedador (Zheng *et al.* 2017), modulan su comportamiento (Jones *et al.* 2018) y participan en la detoxificación de pesticidas (El Khoury, Giovenazzo y Derome 2022) y la protección frente a otros contaminantes como los microplásticos (Wang *et al.* 2021). Por tanto, el establecimiento adecuado de la microbiota intestinal es fundamental para la conservación de estos insectos.

Aunque la composición de la microbiota intestinal de las abejas adultas es relativamente estable, existen ciertos factores como la edad de la abeja (Anderson *et al.* 2016; Dong *et al.* 2020), la estación del año (Kešnerová *et al.* 2020; Jabal-Uriel *et al.* 2022a) y la nutrición (Maes *et al.* 2016; Castelli *et al.* 2020), que pueden influir en la abundancia de algunas especies bacterianas.

Los agentes nosógenos bióticos como los parásitos también pueden tener impacto en la composición y estabilidad de la microbiota intestinal. Entre ellos, los más prevalentes a nivel mundial son el ácaro *V. destructor* (Rosenkranz, Aumeier y Ziegelmann 2010; Traynor *et al.* 2020; Bruce Krejčí *et al.* 2023) y el microsporidio *N. ceranae* ((MacInnis, Keddie y Pernal 2020; Higes, Martín-Hernández y Meana 2006; Cox-Foster *et al.* 2007; Klee *et al.* 2007; Giersch *et al.* 2009; Ansari *et al.* 2017). Por otro lado, en la última década, el tripanosomátido *L. passim* se ha detectado en numerosas regiones del planeta (Vejnovic *et al.* 2018; Xu *et al.* 2018; Williams, Tripodi y Szalanski 2019; Castelli *et al.* 2019; Hall *et al.* 2021; Bordin *et al.* 2022). Este parásito coloniza el aparato digestivo de las abejas y podría tener un impacto en las bacterias intestinales debido a su contacto directo con ellas.

A pesar del aumento significativo en los últimos años de los trabajos que abordan el impacto de los parásitos en la microbiota intestinal, aún quedan multitud de aspectos básicos que descubrir sobre las interacciones entre microbiota, parásito y hospedador.

Los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral aportan nuevos conocimientos sobre la microbiota intestinal de las abejas, investigando la

influencia de parásitos de alta prevalencia a nivel mundial en las principales bacterias que la componen. Además, aborda la importancia que tienen ciertos factores como la edad en el momento de la infección, en este caso por el microsporidio *N. ceranae*, en el desarrollo de la microbiota intestinal. También se presentan nuevos datos sobre la prevalencia de tripanosomátidos en zonas geográficas aisladas. Estos hallazgos amplían la comprensión de las interacciones entre las bacterias intestinales, los parásitos y factores intrínsecos de las abejas.

Los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que el ADN extraído de muestras de abejas mediante ciertos protocolos y conservado de forma adecuada durante un largo período de tiempo puede ser utilizado para el análisis molecular de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos sin reducir eficacia y aportando resultados fiables (**Capítulo I**). Se han estudiado abejas del archipiélago de las Azores, donde las restricciones de movimientos de colonias de abejas y las prohibiciones en la importación de reinas han limitado la expansión por todo el archipiélago de *V. destructor* y *N. ceranae*. Sin embargo, se ha observado una alta prevalencia de *L. passim* en todas las islas y una correlación positiva de ésta con la presencia de *V. destructor* (**Capítulo II**). Además, se ha realizado un análisis metataxonómico de abejas de cuatro de estas islas con una combinación diferente en cuanto a la presencia de *V. destructor* y *N. ceranae*, caracterizando la microbiota intestinal de las abejas que nunca han estado expuestas a estos patógenos (**Capítulo III**). Asimismo, se han estudiado las modificaciones producidas por *V. destructor*, *N. ceranae* y *L. passim* en la microbiota intestinal de las abejas, observándose variaciones en la abundancia relativa de ciertos géneros bacterianos intestinales cuando estos parásitos están presentes (**Capítulo III**). Por último, se ha estudiado el efecto que tiene la edad a la que se infectan experimentalmente las abejas por *N. ceranae* en su microbiota intestinal comparando entre abejas infectadas y no infectadas de distintas edades, siendo *G. apicola* la especie bacteriana más influida por la infección y observando diferencias en la carga bacteriana de algunas especies, principalmente en abejas infectadas poco tiempo tras su emergencia y en abejas más viejas (**Capítulo IV**).

Dado que para la realización de los estudios presentados se debían utilizar, en gran parte, muestras de trabajos previos, fue necesario verificar que

los protocolos de extracción del material genético utilizados en esas muestras permitían llevar a cabo los análisis moleculares requeridos (**Capítulo I**). Los resultados mostraron que el material genético extraído mediante el sistema automático *Bio.Sprint*, y conservado en congelación, resultó ser el más eficaz en la obtención de ADN, aumentando la sensibilidad de las técnicas moleculares para la detección y cuantificación de bacterias intestinales, microsporidios y tripanosomátidos de las abejas. En este contexto, existen algunos estudios que destacan la eficacia de los paquetes comerciales frente a otros métodos como la extracción con fenol-cloroformo o incubación con tampones específicos; sin embargo, estos estudios han sido realizados en otros contextos, como el análisis de muestras fecales para el estudio de bacterias intestinales humanas (McOrist, Jackson y Bird 2002) o animales (Li *et al.* 2003), la detección temprana de la tuberculosis (Aldous *et al.* 2005) o la genotipificación de polimorfismos en muestras de sangre humanas (Ríos Sánchez *et al.* 2016). Aunque estas investigaciones proporcionan una referencia valiosa, es posible que no sean directamente aplicables al estudio de la microbiota y los patógenos de las abejas.

Solo el estudio de Rodríguez-García *et al.* (2014) realizado por nuestro grupo de investigación comparó diferentes métodos de extracción de ADN para la detección posterior por PCR convencional de *N. ceranae* y *N. apis*. Entre los métodos evaluados, se observó que la incubación con tampón TE ofrecía resultados comparables al sistema automático *Bio.Sprint*, como también se confirma en el **Capítulo I**. El estudio llevado a cabo en esta tesis amplía significativamente el trabajo realizado por Rodríguez-García *et al.* (2014) al evaluar un mayor número de métodos de extracción de ADN y su idoneidad para el análisis de microorganismos como microsporidios, tripanosomátidos y bacterias intestinales por PCR convencional y por qPCR. Este enfoque representa el primer análisis integral que aborda la extracción de ADN de muestras de abejas para la detección y cuantificación de diversos microorganismos a partir de la misma muestra, ofreciendo una base metodológica sólida para futuros estudios que sigan esta misma línea de investigación.

Por tanto, el material genético extraído mediante el sistema automático de las muestras de Azores podía utilizarse de manera fiable para la detección de tripanosomátidos tanto por PCR como por qPCR, a pesar de llevar tiempo

en congelación (**Capítulo II**). Este estudio también concluyó que el método de extracción basado en el tampón Tris-EDTA, con el que se extrajo el ADN de las muestras del **Capítulo IV**, era completamente válido para el análisis de las bacterias intestinales. Además, también sirvió para determinar el volumen óptimo de extracto de ADN para la detección y cuantificación de cada microorganismo, por lo que, en base a dichos resultados, se ajustaron los protocolos utilizados en el resto de los capítulos de esta tesis. Por último, dado que el sistema automático aportó los mejores resultados y el ADN extraído al final del proceso queda además purificado, se diseñó el protocolo de extracción de ADN con el que se procesaron las muestras del **Capítulo III** para su análisis metataxonómico.

Este trabajo destaca la importancia de seleccionar metodologías de extracción y análisis específicas para cada microorganismo, ya que lo que puede ser eficaz para uno puede no serlo para otro. La opción ideal sería implementar protocolos que permitan el análisis de diversos microorganismos a partir de la misma muestra, optimizando así los recursos y el tiempo de procesamiento. Sin embargo, se utilizan numerosos protocolos de extracción de ADN para el estudio genético de las abejas melíferas, de sus parásitos y de sus bacterias intestinales (De La Rúa *et al.* 2004; Muñoz *et al.* 2008; Stevanovic *et al.* 2011; Martín-Hernández *et al.* 2012; Vejnovic *et al.* 2018; Kešnerová *et al.* 2020; Urbietta-Magro *et al.* 2019b; Arismendi *et al.* 2020; Quintana *et al.* 2021; Naree *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2021), por lo que podría explicar la gran diversidad de resultados entre laboratorios (Duquesne *et al.* 2017), lo que dificulta la comparación de resultados entre estudios.

Un aspecto innovador en esta tesis radica en que se lleva a cabo el estudio de abejas en áreas donde no ha habido presencia de dos de los patógenos más prevalentes a nivel mundial, *V. destructor* y *N. ceranae*. Este enfoque convierte el análisis de la microbiota intestinal en un estudio pionero, ya que, hasta la fecha, todos los estudios previos han utilizado abejas de localizaciones que ya han estado expuestas a estos patógenos (Powell *et al.* 2014; D'Alvise *et al.* 2018; Hubert *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2019; Dong *et al.* 2020; Bleau *et al.* 2020; Castelli *et al.* 2020; Jabal-Uriel *et al.* 2022a).

La caracterización de la microbiota intestinal de las abejas de Santa María (**Capítulo III**), que no han estado expuestas a *V. destructor* ni *N. ceranae*,

reveló que las bacterias intestinales de las abejas melíferas se mantienen bastante conservadas gracias a una relación simbiótica de miles de años de evolución conjunta, como previamente se había descrito (Martinson *et al.* 2011; Vásquez *et al.* 2012; Steele y Moran 2021).

Sin embargo, *G. apicola* una especie considerada troncal en el intestino de las abejas se encontró en una abundancia relativa muy baja en las islas Azores (**Capítulo III**), lo que contrasta con otras regiones del mundo que se encuentra en una abundancia más elevada (Powell *et al.* 2014; Dong *et al.* 2020; Bleau *et al.* 2020b; Castelli *et al.* 2022; Jabal-Uriel, Alba, *et al.* 2022). Es posible que la elevada abundancia de *G. apicola* observada en estos estudios se deba a la influencia de *N. ceranae*, ya que el aumento de esta especie se ha sugerido como un marcador de disbiosis intestinal asociado al microsporidio (Maes *et al.* 2016), que concuerda con lo observado en el **Capítulo III** y el **Capítulo IV**.

Además, *Bartonella* mostró una abundancia elevada en las abejas de Santa María y de forma general en el archipiélago de Azores, a pesar de que es considerada como una bacteria no troncal en el intestino de las abejas (Bonilla-Rosso y Engel 2018; Zheng *et al.* 2018; Kešnerová *et al.* 2020; Motta y Moran 2024). Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que *Bartonella* pudo haber sido una bacteria abundante en el intestino de las abejas antes de la parasitación de *V. destructor* y *N. ceranae*. Sin embargo, el papel de *Bartonella* en la salud de las abejas no está del todo claro. Análisis filogenéticos recientes han identificado como simbioses nutricionales las especies ancestrales de la familia Bartonellaceae, cercanas a *Ba. apis*, que habitan en el intestino de otros himenópteros como las hormigas (Neuvonen *et al.* 2016; Bisch *et al.* 2018). Esto sugiere que en las abejas podrían tener esta misma función (Segers *et al.* 2017). Algunas de las especies de este género se han asociado con artrópodos como pulgas y garrapatas (Wagner y Dehio 2019) y adquirieron factores de virulencia que les permitió convertirse en patógenas cuando los artrópodos a los que estaban asociadas se convirtieron en parásitos de mamíferos, entre los que se incluyen los humanos (Engel *et al.* 2011; Segers *et al.* 2017). En el caso de *Ba. apis*, además de su coevolución para formar parte de la microbiota intestinal de las abejas melíferas, parece estar asociada con *V. destructor* (Hubert *et al.* 2015), lo que explicaría que la expansión del ácaro en las colonias aumente la abundancia de *Ba. apis* (**Capítulo III**).

El ácaro *V. destructor* es un ectoparásito que se adhiere a la superficie de la abeja y el cual rompe la cutícula con sus quelíceros para alimentarse fundamentalmente del cuerpo graso y de la hemolinfa de la abeja (Ramsey *et al.* 2019; Han *et al.* 2024). El hecho de que no existe una interacción directa entre el ácaro y la microbiota intestinal puede explicar que los estudios que abordan su influencia en la microbiota intestinal sean muy reducidos (Hubert *et al.* 2015; 2016; Marche *et al.* 2019; Kim, Kim y Park 2023). Sin embargo, el estrés fisiológico e inmunológico que genera en el hospedador y la transmisión de otros patógenos, afectan a la salud general de la abeja y puede tener su repercusión en la microbiota intestinal. De hecho, las lesiones en la cutícula de la abeja para alimentarse pueden favorecer la entrada de bacterias (Kanbar y Engels 2003). Además, la pérdida de agua, nutrientes, hemocitos y hormonas causada por el ácaro (Bowen-Walker y Gunn 2001; Annoscia, Del Piccolo y Nazzi 2012; Annoscia *et al.* 2019), junto con la pérdida de cuerpo graso, involucrado en funciones de crecimiento, almacenamiento y movilización de energía, respuesta inmune y síntesis de proteínas de grasas (Arrese y Soulages 2010), genera un debilitamiento general de la abeja. Además, se ha comprobado que las abejas que emergen con ácaros presentan una reducción en la expresión de genes inmunitarios (Marche *et al.* 2019). Este estado de estrés, tanto fisiológico como inmunológico, junto con la transmisión de otros patógenos (Marche *et al.* 2019; Annoscia *et al.* 2019), podría favorecer la proliferación de otros microorganismos. A este respecto, en el **Capítulo III** se observó que las abejas de Flores, isla con *V. destructor*, mostraron una mayor abundancia de géneros atípicos en comparación con Santa María, isla libre de *V. destructor*.

El virus de las alas deformadas (DWV) que transmite *V. destructor* (Chen, Evans y Feldlaufer 2006; Wilfert *et al.* 2016), tiene un tropismo tisular muy amplio y se encuentra y multiplica en diversos órganos de la abeja (Boncristiani *et al.* 2009). También puede adquirirse por el alimento (Chen, Evans y Feldlaufer 2006) y desde el aparato digestivo extenderse a otros órganos como las alas, donde se replica mayoritariamente (Boncristiani *et al.* 2009). Otros virus como el virus de la realeras negras (BQCV) o el virus Kashmir (KBV) pueden replicarse en el epitelio intestinal de las abejas (Chen y Siede 2007). Sin embargo, no existen estudios que aborden la relación entre estos virus y las bacterias intestinales, por lo que sería muy interesante

investigar si los virus son posibles agentes que modifican la microbiota intestinal de las abejas.

El estrés nutricional y social de las abejas también parece favorecer la susceptibilidad a la parasitación por tripanosomátidos (Schwarz, Moran y Evans 2016). Además, la prevalencia de *L. passim* se vio positivamente asociada con la presencia de *V. destructor* (**Capítulo II**), en línea con otros estudios en los que también se ha descrito una asociación entre ellos (Castelli *et al.* 2019; Quintana *et al.* 2021). Por tanto, si el ácaro afecta negativamente a las bacterias intestinales del íleon (**Capítulo III**) podría facilitar que *L. passim* se establezca en esta región (Buendía-Abad *et al.* 2022a; de Paula *et al.* 2024), lo cual explicaría la asociación observada entre *V. destructor* y *L. passim*. Es posible que los tripanosomátidos sean patógenos facultativos en las abejas dado que, como se demuestra en el **Capítulo II**, parecen haber estado asociados a ellas desde hace mucho más tiempo del que se pensaba. En este contexto, cuando se producen alteraciones en el equilibrio intestinal, los tripanosomátidos podrían aprovechar para colonizar el intestino de forma más efectiva (Schwarz, Moran y Evans 2016), desarrollando su acción patógena y reduciendo la esperanza de vida de la abeja (Higes *et al.* 2016; Gómez-Moracho *et al.* 2020; Buendía-Abad *et al.* 2021). Asimismo, al colonizar el íleon, *L. passim* podría desplazar la formación de la biopelícula de *G. apicola* y *S. alvi*, lo que explica la menor abundancia de estas bacterias en las abejas de colmenas parasitadas con *L. passim* (**Capítulo III**).

En este sentido, la infección por *L. passim* podría darse con mayor facilidad si el intestino se encuentra libre o con pocos bacterias como sucede con las abejas recién emergidas o con las que aún no tienen completamente desarrollada su microbiota (Powell *et al.* 2014; Dong *et al.* 2020; Cai *et al.* 2022; **Capítulo III**). Por lo tanto, la edad a la que ocurra la parasitación por *L. passim* puede ser un factor clave en el desarrollo de la infección por este tripanosomátido, sin embargo, esto aún no se ha estudiado. Sin embargo, al igual que sucede con *V. destructor*, hay muy pocos estudios que hayan estudiado la influencia de tripanosomátidos en la microbiota intestinal de las abejas, mostrando no tener influencia en ella (Hubert *et al.* 2017; Liu *et al.* 2020). No obstante, se ha descrito que cuando las abejas cuentan con una nutrición adecuada y una microbiota intestinal bien desarrollada, son capaces de regular la parasitación por *L. passim* (Schwarz, Moran y Evans 2016).

En cambio, en el caso de *N. ceranae*, si se ha demostrado que la edad a la que se infectan las abejas es un factor importante tanto para el desarrollo de la infección (Urbietta-Magro *et al.* 2019b) como para el establecimiento de la microbiota intestinal (**Capítulo IV**). Las abejas que se infectan con el microsporidio dentro de las 48 horas después de su emergencia son más susceptibles a la infección (Urbietta-Magro *et al.* 2019b). El escaso desarrollo de las membranas peritróficas en el ventrículo de las abejas de esta edad (de Oliveira *et al.* 2023) puede ser un factor que explique la susceptibilidad a la infección. Además, en este tramo de edad las abejas están adquiriendo la microbiota intestinal y las bacterias típicas aún no se han establecido correctamente (**Capítulo III**) por lo que el papel protector frente a infección por *N. ceranae* puede no haberse desarrollado en su totalidad (Li *et al.* 2017).

*N. ceranae* afecta al metabolismo de los carbohidratos de la abeja alterando sus rutas metabólicas (Holt, Aronstein y Grozinger 2013; Panek *et al.* 2018), y aumentando la pérdida de proteínas y lípidos en la abeja (Li, Chen y Cook 2018; Li *et al.* 2019), produciendo un estrés energético que induce al aumento en el consumo de alimento (Alaux *et al.* 2010; Martín-Hernández *et al.* 2011; Vidau *et al.* 2014). La infección por *N. ceranae* también parece tener un efecto en la regulación de genes relacionados con la inmunidad de las abejas, reduciendo la expresión de genes como abaecina, himenoptaecina, glucosa deshidrogenasa, defensina y vitelogenina (Antúnez *et al.* 2009; Chaimanee *et al.* 2012; Badaoui *et al.* 2017) y aumentando la expresión de otros genes como los relacionados con las ROS. Todo ello confirma que el microsporidio suprime los mecanismos de defensa inmunitaria de las abejas. Por tanto, el daño tisular generado en el ventrículo junto con las alteraciones en el sistema inmunitario de la abeja podría favorecer el crecimiento de otras bacterias. Este fenómeno se ha observado en el **Capítulo III**, donde Terceira, isla con *N. ceranae*, registró una mayor abundancia de bacterias atípicas en las abejas. Además, en Pico, isla donde también se encuentra presente *V. destructor*, fue donde se registró la mayor abundancia de estos géneros bacterianos atípicos, lo que sugiere que la coexistencia de varios parásitos incrementa las alteraciones en la microbiota intestinal. Esto se refuerza con el hecho de que las abejas de Santa María, isla sin ninguno de estos dos parásitos, mostraron una menor abundancia de estas bacterias atípicas (**Capítulo III**).

La infección por *N. ceranae*, además, parece tener un impacto significativo en la abundancia de *G. apicola*, como han reportado otros autores (Rubanov *et al.* 2019; Paris *et al.* 2020; Castelli *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2021; Rouzé *et al.* 2019; Lau *et al.* 2024). De hecho, también se observó en abejas infectadas con *N. ceranae* de las islas Azores (**Capítulo III**) y en las abejas infectadas experimentalmente con el microsporidio (**Capítulo IV**). Por lo que parece confirmarse que *G. apicola* puede ser un marcador de disbiosis intestinal asociado a *N. ceranae* (Maes *et al.* 2016).

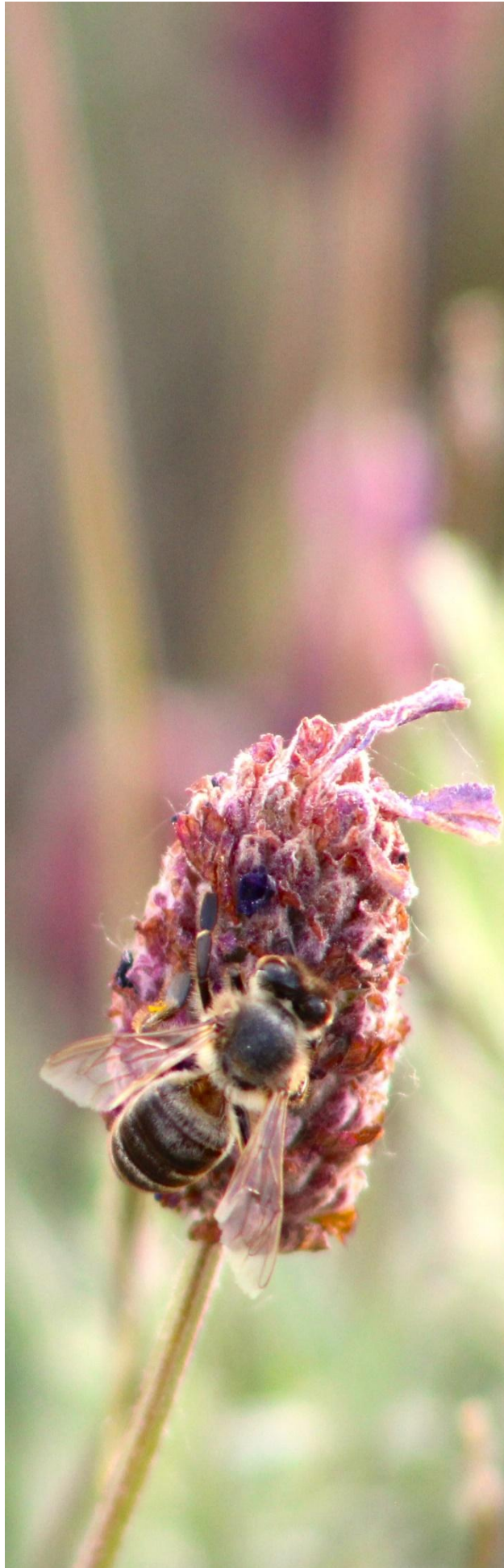
Sería especialmente interesante el estudio de la microbiota intestinal de abejas que nunca hayan estado expuestas a ninguno de los parásitos mencionados. Sin embargo, el hecho de que *L. passim* se encuentre presente incluso en zonas que han escapado de *V. destructor* y *N. ceranae* (**Capítulo II**), las cuales son muy escasas, hace complicado el estudio de la microbiota primitiva en abejas melíferas sin parásitos y, por tanto, limita la posibilidad de evaluar la influencia real de estos parásitos en ella. Esto convierte al **Capítulo III** en uno de los pocos estudios que puede ofrecer relaciones claras entre estos parásitos y la microbiota intestinal relativamente intacta de las abejas melíferas.

La microbiota intestinal de las abejas ejerce una función de protección frente a parásitos y patógenos. De hecho, ha demostrado tener un efecto protector frente a *N. ceranae*, ya que el tratamiento de las abejas con antibióticos para eliminar las bacterias intestinales se tradujo en un aumento en la proliferación de *N. ceranae* y afectó negativamente a la respuesta inmunitaria de la abeja (Li *et al.* 2017). También se ha demostrado una función protectora frente a tripanosomátidos en abejas que poseen una microbiota bien desarrollada (Schwarz, Moran y Evans 2016), y frente a virus (Dosch *et al.* 2021). Con respecto a esto último, la supervivencia parece aumentar significativamente en abejas infectadas con DWV con una microbiota intestinal bien establecida en comparación con las abejas con una microbiota perturbada (en disbiosis) (Dosch *et al.* 2021). Sin embargo, esto no se tradujo en una disminución de la carga viral en las abejas, lo que apunta a una mayor tolerancia viral en las abejas con microbiota intestinal normal, demostrando un papel positivo en la aptitud de las abejas melíferas en caso de infección vírica (Dosch *et al.* 2021). En el caso de *V. destructor* no está claro este papel protector de la microbiota frente al ácaro. Un estudio previo mostró como

algunas bacterias intestinales como *B. asteroides* o *A. kunkkei* podrían actuar como potenciales acaricidas (Saccà y Lodesani 2020). Por otro lado, una línea de investigación reciente ha modificado genéticamente la bacteria intestinal *S. alvi* para inducir respuestas inmunitarias mediante ARN de interferencia (ARNi) (Leonard *et al.* 2020). Al administrarse a las abejas, estas bacterias activaron la respuesta de ARNi en los ácaros, reduciendo tanto la supervivencia de *V. destructor* como la replicación del virus DWV, aumentando así la supervivencia de las abejas infectadas.

No obstante, esta función protectora de la microbiota intestinal parece ser insuficiente para detener la infecciones causadas por algunos parásitos como *V. destructor*, *N. ceranae* o *L. passim*. Asimismo, dado que están ampliamente distribuidos a nivel mundial, es muy probable que numerosas colonias de abejas se encuentren parasitadas simultáneamente por todos ellos. Como se ha observado en el **Capítulo III** y el **Capítulo IV**, los tres tienen la capacidad de alterar la microbiota intestinal de las abejas. Este efecto, sumado a los efectos patogénicos directos que producen en ellas, hace que el estrés adicional en el ecosistema intestinal pueda ser un factor más que deteriora la salud de las abejas y que contribuye a la pérdida de colmenas a nivel mundial.

## CONCLUSIONES

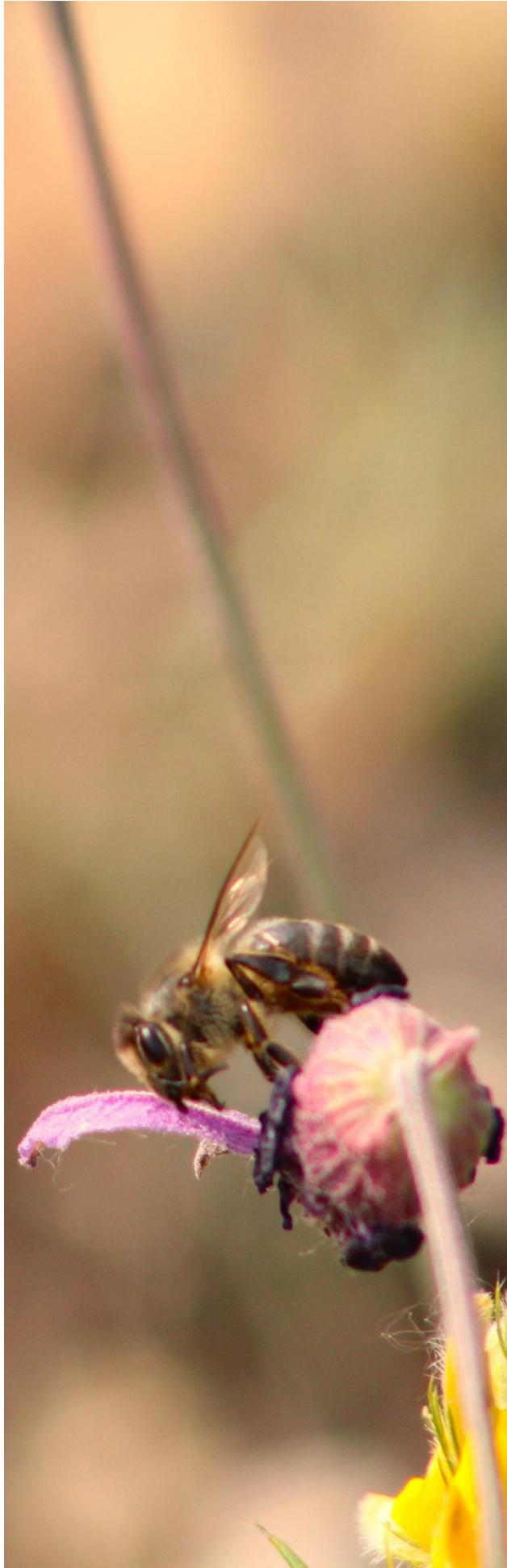


## Conclusiones

- I. La optimización de protocolos de extracción de ADN es fundamental para obtener resultados precisos y fiables a la hora de seleccionar los métodos más apropiados para el estudio de parásitos y bacterias intestinales de las abejas melíferas.
- II. Los tripanosomátidos presentan una elevada prevalencia en las islas Azores, siendo *L. passim* la especie predominante. Esto sugiere una colonización de las islas anterior a la expansión de otros patógenos como *V. destructor* y *N. ceranae*, ya que este tripanosomátido aparece en islas libres de estos patógenos. De otra parte, la prevalencia de *L. passim* fue superior en las islas donde *V. destructor* está presente.
- III. La microbiota intestinal de las abejas de las islas Azores se encuentra muy conservada en cuanto a la composición de géneros bacterianos al compararla con lo descrito en otras localizaciones geográficas, siendo destacable la abundancia elevada del género *Bartonella* en estas islas.
- IV. La parasitación por *V. destructor*, *N. ceranae* y *L. passim* modula, principalmente, la abundancia de las bacterias presentes en el ileon. *Varroa destructor* y *L. passim* reducen los niveles de los géneros *Snodgrassella* y *Gilliamella*, y aumentan los de *Bartonella*. Por el contrario, *N. ceranae*, incrementa la abundancia de los géneros *Gilliamella*, *Frischella* y *Lactobacillus*, y reduce la de *Snodgrassella*.
- V. La edad a la que se infectan las abejas de manera experimental con el microsporidio *N. ceranae* es un factor determinante en el establecimiento de su microbiota intestinal. Las abejas que se infectan dentro de las primeras 24 horas tras su emergencia ven aumentada la carga bacteriana de casi todas las especies que componen la microbiota intestinal.
- VI. *Gilliamella apicola* es la bacteria que se ve más influenciada por la infección por *N. ceranae*, aumentando su abundancia en el intestino de las abejas infectadas tanto en laboratorio como en condiciones de campo, por lo que podría ser un marcador de disbiosis intestinal asociado a la infección por el microsporidio.

## Conclusiones

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## Referencias Bibliográficas

- ADAIR, K.L. y DOUGLAS, A.E., 2017. Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology* [en línea], vol. 35, ISSN 18790364. DOI 10.1016/j.mib.2016.11.002.
- ADLER, L.S., MICHAUD, K.M., ELLNER, S.P., MCART, S.H., STEVENSON, P.C. y IRWIN, R.E., 2018. Disease where you dine: plant species and floral traits associated with pathogen transmission in bumble bees. *Ecology* [en línea], vol. 99, no. 11, ISSN 0012-9658. DOI 10.1002/ecy.2503.
- ALAUX, C., DUCLOZ, F., CRAUSER, D. y LE CONTE, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* [en línea], vol. 6, no. 4, ISSN 1744-9561. DOI 10.1098/rsbl.2009.0986.
- ALAUX, C., FOLSCHWEILLER, M., MCDONNELL, C., BESLAY, D., COUSIN, M., DUSSAUBAT, C., BRUNET, J.L. y CONTE, Y. Le, 2011. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 106, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2010.12.005.
- ALBERONI, D., DI GIOIA, D. y BAFFONI, L., 2023. Alterations in the Microbiota of Caged Honeybees in the Presence of *Nosema ceranae* Infection and Related Changes in Functionality. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 86, no. 1, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-022-02050-4.
- ALDOUS, W.K., POUNDER, J.I., CLOUD, J.L. y WOODS, G.L., 2005. Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* [en línea], vol. 43, no. 5, ISSN 0095-1137. DOI 10.1128/JCM.43.5.2471-2473.2005.
- ALONSO-PRADOS, E., MUÑOZ, I., DE LA RÚA, P., SERRANO, J., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., GARCÍA-VALCÁRCCEL, A.I., HERNANDO, M.D., ALONSO, Á., ALONSO-PRADOS, J.L., BARTOLOMÉ, C., MASIDE, X., BARRIOS, L., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2020. The toxic unit approach as a risk indicator in honey bees surveillance programmes: A case of study in *Apis mellifera iberiensis*. *Science of The Total Environment* [en línea], vol. 698, ISSN 00489697. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.134208.
- AMDAM, G.V. y OMHOLT, S.W., 2002. The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology* [en línea], vol. 216, no. 2, ISSN 00225193. DOI 10.1006/jtbi.2002.2545.

- ANDERSON, D.L. y TRUEMAN, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, vol. 24, no. 3, ISSN 01688162. DOI <https://doi.org/10.1023/A:1006456720416>.
- ANDERSON, K.E., CARROLL, M.J., SHEEHAN, T., MOTT, B.M., MAES, P. y CORBY-HARRIS, V., 2014. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology* [en línea], vol. 23, no. 23, ISSN 0962-1083. DOI 10.1111/mec.12966.
- ANDERSON, K.E. y RICIGLIANO, V.A., 2017. Honey bee gut dysbiosis: a novel context of disease ecology. *Current Opinion in Insect Science* [en línea], vol. 22, ISSN 22145745. DOI 10.1016/j.cois.2017.05.020.
- ANDERSON, K.E., RICIGLIANO, V.A., COPELAND, D.C., MOTT, B.M. y MAES, P., 2023. Social Interaction is Unnecessary for Hindgut Microbiome Transmission in Honey Bees: The Effect of Diet and Social Exposure on Tissue-Specific Microbiome Assembly. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 85, no. 4, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-022-02025-5.
- ANDERSON, K.E., RODRIGUES, P.A.P., MOTT, B.M., MAES, P. y CORBY-HARRIS, V., 2016. Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in *Lactobacillus* Strain Dominance During Early Adult Development. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 71, no. 4, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-015-0716-2.
- ANDERSON, K.E., SHEEHAN, T.H., MOTT, B.M., MAES, P., SNYDER, L., SCHWAN, M.R., WALTON, A., JONES, B.M. y CORBY-HARRIS, V., 2013. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). En: N.M. GERARDO (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 8, no. 12, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0083125.
- ANDREARCZYK, S. y KNAGA, S., 2014. Influence of a probiotic on the mortality, sugar syrup ingestion and infection of honeybees with *Nosema* spp. under laboratory assessment. *Medycyna Weterynaryjna*, vol. 70, no. 12, ISSN 0025-8628.
- ANNOSCIA, D., BROWN, S.P., DI PRISCO, G., DE PAOLI, E., DEL FABBRO, S., FRIZZERA, D., ZANNI, V., GALBRAITH, D.A., CAPRIO, E., GROZINGER, C.M., PENNACCHIO, F. y NAZZI, F., 2019. Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the*

- Royal Society B: Biological Sciences [en línea], vol. 286, no. 1901, ISSN 0962-8452. DOI 10.1098/rspb.2019.0331.
- ANNOSCIA, D., DEL PICCOLO, F. y NAZZI, F., 2012. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology* [en línea], vol. 58, no. 12, ISSN 00221910. DOI 10.1016/j.jinsphys.2012.09.008.
- ANSARI, M.J., AL-GHAMDI, A., NURU, A., KHAN, K.A. y ALATTAL, Y., 2017. Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* [en línea], vol. 24, no. 5, ISSN 1319562X. DOI 10.1016/j.sjbs.2017.01.054.
- ANTÚNEZ, K., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., PRIETO, L., MEANA, A., ZUNINO, P. y HIGES, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 11, no. 9, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.
- ARES, A.M., NOZAL, M.J., BERNAL, J.L., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., M.HIGES y BERNAL, J., 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B* [en línea], vol. 899, ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2012.05.016.
- ARISMENDI, N., BRUNA, A., ZAPATA, N. y VARGAS, M., 2016. PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 134, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2015.12.008.
- ARISMENDI, N., CARO, S., CASTRO, M.P., VARGAS, M., RIVEROS, G. y VENEGAS, T., 2020. Impact of Mixed Infections of Gut Parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the Lifespan and Immune-related Biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects* [en línea], vol. 11, no. 7, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects11070420.
- ARISMENDI, N., CASTRO, M.P., VARGAS, M., ZAPATA, C. y RIVEROS, G., 2022. The trypanosome *Lotmaria passim* prevails in honey bees of different ages and stages of development. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 61, no. 1, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2020.1828239.
- ARONSTEIN, K.A., SALDIVAR, E., VEGA, R., WESTMILLER, S. y DOUGLAS, A.E., 2012. How *Varroa* Parasitism Affects the Immunological and Nutritional

## Referencias Bibliográficas

- Status of the Honey Bee, *Apis mellifera*. Insects [en línea], vol. 3, no. 3, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects3030601.
- ARREDONDO, D., CASTELLI, L., PORRINI, M.P., GARRIDO, P.M., EGUARAS, M.J., ZUNINO, P. y ANTÚNEZ, K., 2018. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. Beneficial Microbes [en línea], vol. 9, no. 2, ISSN 1876-2883. DOI 10.3920/BM2017.0075.
- ARRESE, E.L. y SOULAGES, J.L., 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. Annual Review of Entomology [en línea], vol. 55, no. 1, ISSN 0066-4170. DOI 10.1146/annurev-ento-112408-085356.
- AUFAUVRE, J., MISME-AUCOUTURIER, B., VIGUÈS, B., TEXIER, C., DELBAC, F. y BLOT, N., 2014. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. En: G. SMAGGHE (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 9, no. 3, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0091686.
- BADAOU, B., FOUGEROUX, A., PETIT, F., ANSELMO, A., GORNI, C., CUCURACHI, M., CERSINI, A., GRANATO, A., CARDETI, G., FORMATO, G., MUTINELLI, F., GIUFFRA, E., WILLIAMS, J.L. y BOTTI, S., 2017. RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. En: O. RUEPPELL (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 12, no. 3, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0173438.
- BARTOLOMÉ, C., BUENDÍA-ABAD, M., BENITO, M., SOBRINO, B., AMIGO, J., CARRACEDO, A., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M. y MASIDE, X., 2020. Longitudinal analysis on parasite diversity in honeybee colonies: new taxa, high frequency of mixed infections and seasonal patterns of variation. Scientific Reports [en línea], vol. 10, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-020-67183-3.
- BARTOLOMÉ, C., BUENDÍA-ABAD, M., ORNOSA, C., DE LA RÚA, P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M. y MASIDE, X., 2022. Bee Trypanosomatids: First Steps in the Analysis of the Genetic Variation and Population Structure of *Lotmaria passim*, *Crithidia bombi* and *Crithidia mellificae*. Microbial Ecology [en línea], vol. 84, no. 3, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-021-01882-w.
- BARTOLOMÉ, C., BUENDÍA, M., BENITO, M., DE LA RÚA, P., ORNOSA, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M. y MASIDE, X., 2018. A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 154, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2018.03.015.

- BARTOLOMÉ, C., JABAL-URIEL, C., BUENDÍA-ABAD, M., BENITO, M., ORNOSA, C., DE LA RÚA, P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M. y MASIDE, X., 2021. Wide diversity of parasites in *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) revealed by a high-throughput sequencing approach. *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 23, no. 1, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/1462-2920.15336.
- BASS, D., CZECH, L., WILLIAMS, B.A.P., BERNEY, C., DUNTHORN, M., MAHÉ, F., TORRUELLA, G., STENTIFORD, G.D. y WILLIAMS, T.A., 2018. Clarifying the Relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology* [en línea], vol. 65, no. 6, ISSN 1066-5234. DOI 10.1111/jeu.12519.
- BASSET, Y., CIZEK, L., CUÉNOUD, P., DIDHAM, R.K., GUILHAUMON, F., MISSA, O., NOVOTNY, V., ØDEGAARD, F., ROSLIN, T., SCHMIDL, J., TISHECHKIN, A.K., WINCHESTER, N.N., ROUBIK, D.W., ABERLENC, H.-P., BAIL, J., BARRIOS, H., BRIDLE, J.R., CASTAÑO-MENESES, G., CORBARA, B., CURLETTI, G., DUARTE DA ROCHA, W., DE BAKKER, D., DELABIE, J.H.C., DEJEAN, A., FAGAN, L.L., FLOREN, A., KITCHING, R.L., MEDIANERO, E., MILLER, S.E., GAMA DE OLIVEIRA, E., ORIVEL, J., POLLET, M., RAPP, M., RIBEIRO, S.P., ROISIN, Y., SCHMIDT, J.B., SØRENSEN, L. y LEPONCE, M., 2012. Arthropod Diversity in a Tropical Forest. *Science* [en línea], vol. 338, no. 6113, ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.1226727.
- BELLETE, B., FLORI, P., HAFID, J., RABERIN, H. y TRAN MANH SUNG, R., 2003. Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler®. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 55, no. 1, ISSN 01677012. DOI 10.1016/S0167-7012(03)00141-6.
- BENITO-MURCIA, M., 2023. Impacto de la exposición crónica a los principales acaricidas utilizados para el control de la varroosis tanto en el parásito (*Varroa destructor*), como en su hospedador (*Apis mellifera*). Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- BENITO-MURCIA, M., BARTOLOMÉ, C., MASIDE, X., BERNAL, J., BERNAL, J.L., DEL NOZAL, M.J., MEANA, A., BOTÍAS, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2021. Residual Tau-Fluvalinate in Honey Bee Colonies Is Coupled with Evidence for Selection for *Varroa destructor* Resistance to Pyrethroids. *Insects* [en línea], vol. 12, no. 8, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects12080731.

- BENITO-MURCIA, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., BOTÍAS, C. y HIGES, M., 2022. Study of pyrethroid resistance mutations in populations of *Varroa destructor* across Spain. *Research in Veterinary Science* [en línea], vol. 152, no. July, ISSN 00345288. DOI 10.1016/j.rvsc.2022.07.021.
- BENVAU, L.R. y NIEH, J.C., 2017. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific Reports* [en línea], vol. 7, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-017-14702-4.
- BERG, G., RYBAKOVA, D., FISCHER, D., CERNAVA, T., VERGÈS, M.-C.C., CHARLES, T., CHEN, X., COCOLIN, L., EVERSOLE, K., CORRAL, G.H., KAZOU, M., KINKEL, L., LANGE, L., LIMA, N., LOY, A., MACKLIN, J.A., MAGUIN, E., MAUCLINE, T., MCCLURE, R., MITTER, B., RYAN, M., SARAND, I., SMIDT, H., SCHELKLE, B., ROUME, H., KIRAN, G.S., SELVIN, J., SOUZA, R.S.C. de, VAN OVERBEEK, L., SINGH, B.K., WAGNER, M., WALSH, A., SESSITSCH, A. y SCHLOTTER, M., 2020. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* [en línea], vol. 8, no. 1, ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/s40168-020-00875-0.
- BERNKLAU, E., BJOSTAD, L., HOGEBROOM, A., CARLISLE, A. y H. S., A., 2019. Dietary Phytochemicals, Honey Bee Longevity and Pathogen Tolerance. *Insects* [en línea], vol. 10, no. 1, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects10010014.
- BIAVATI, B., VESCOVO, M., TORRIANI, S. y BOTTAZZI, V., 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. *Annals of Microbiology*, vol. 50, no. 2, ISSN 15904261.
- BIGLIARDI, E. y SACCHI, L., 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* [en línea], vol. 3, no. 5, ISSN 12864579. DOI 10.1016/S1286-4579(01)01393-4.
- BISCH, G., NEUVONEN, M.-M., PIERCE, N.E., RUSSELL, J.A., KOGA, R., SANDERS, J.G., ŁUKASIK, P. y ANDERSSON, S.G.E., 2018. Genome Evolution of *Bartonellaceae* Symbionts of Ants at the Opposite Ends of the Trophic Scale. En: E. MARTINEZ-ROMERO (ed.), *Genome Biology and Evolution* [en línea], vol. 10, no. 7, ISSN 1759-6653. DOI 10.1093/gbe/evy126.
- BLASCO-LAVILLA, N., LÓPEZ-LÓPEZ, A., RUA, P.D. la y BARRIBEAU, S., 2023. Infection by *Crithidia bombi* increases relative abundance of *Lactobacillus* spp. in the gut of *Bombus terrestris* [en línea]. 16 marzo 2023. S.l.: s.n.
- BLEAU, N., BOUSLAMA, S., GIOVENAZZO, P. y DEROME, N., 2020a. Dynamics of the honeybee (*Apis mellifera*) gut microbiota throughout the overwintering

- period in Canada. *Microorganisms*, vol. 8, no. 8, ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms8081146.
- BLEAU, N., BOUSLAMA, S., GIOVENAZZO, P. y DEROME, N., 2020b. Dynamics of the Honeybee (*Apis mellifera*) Gut Microbiota Throughout the Overwintering Period in Canada. *Microorganisms* [en línea], vol. 8, no. 8, ISSN 2076-2607. DOI 10.3390/microorganisms8081146.
- BONCRISTIANI, H., LI, J., EVANS, J.D., PETTIS, J. y CHEN, Y., 2011. Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie* [en línea], vol. 42, no. 4, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-011-0009-9.
- BONCRISTIANI, H.F., DI PRISCO, G., PETTIS, J.S., HAMILTON, M. y CHEN, Y.P., 2009. Molecular approaches to the analysis of deformed wing virus replication and pathogenesis in the honey bee, *Apis mellifera*. *Virology Journal* [en línea], vol. 6, no. 1, ISSN 1743-422X. DOI 10.1186/1743-422X-6-221.
- BONILLA-ROSSO, G. y ENGEL, P., 2018. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology* [en línea], vol. 43, ISSN 13695274. DOI 10.1016/j.mib.2017.12.009.
- BONILLA-ROSSO, G., PAREDES JUAN, C., DAS, S., ELLEGAARD, K., EMERY, O., GARCIA-GARCERA, M., GLOVER, N., HADADI, N., VAN DER MEER, J., TAGINI, F. y ENGEL, P., 2019. *Acetobacteraceae* in the honey bee gut comprise two distant clades with diverging metabolism and ecological niches [en línea]. DOI: 10.1101/861260.
- BONILLA-ROSSO, G., STEINER, T., WICHMANN, F., BEXKENS, E. y ENGEL, P., 2020. Honey bees harbor a diverse gut virome engaging in nested strain-level interactions with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 117, no. 13, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.2000228117.
- BORDIN, F., ZULIAN, L., GRANATO, A., CALDON, M., COLAMONICO, R., TOSON, M., TREVISAN, L., BIASION, L. y MUTINELLI, F., 2022. Presence of Known and Emerging Honey Bee Pathogens in Apiaries of Veneto Region (Northeast of Italy) during Spring 2020 and 2021. *Applied Sciences* [en línea], vol. 12, no. 4, ISSN 2076-3417. DOI 10.3390/app12042134.
- BORGES, D., GUZMAN-NOVOA, E. y GOODWIN, P.H., 2020. Control of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) using nutraceutical and immuno-stimulatory compounds. En: O. RUEPPELL (ed.),

## Referencias Bibliográficas

- PLOS ONE [en línea], vol. 15, no. 1, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0227484.
- BORGES, D., GUZMAN-NOVOA, E. y GOODWIN, P.H., 2021. Effects of Prebiotics and Probiotics on Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with the Microsporidian Parasite *Nosema ceranae*. *Microorganisms* [en línea], vol. 9, no. 3, ISSN 2076-2607. DOI 10.3390/microorganisms9030481.
- BOTÍAS, C., ANDERSON, D.L., MEANA, A., GARRIDO-BAILÓN, E., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2012. Further evidence of an oriental origin for *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 110, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2012.02.014.
- BOTÍAS, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BARRIOS, L., MEANA, A. y HIGES, M., 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* [en línea], vol. 44, no. 1, ISSN 1297-9716. DOI 10.1186/1297-9716-44-25.
- BOURTZIS, K. y MILLER, T.A., 2003. *Insect Symbiosis* [en línea]. S.l.: CRC Press. ISBN 9780429214592.
- BOWEN-WALKER, P.L. y GUNN, A., 2001. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* [en línea], vol. 101, no. 3, ISSN 0013-8703. DOI 10.1046/j.1570-7458.2001.00905.x.
- BRANCHICCELA, B., CASTELLI, L., CORONA, M., DÍAZ-CETTI, S., INVERNIZZI, C., MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G., MENDOZA, Y., SANTOS, E., SILVA, C., ZUNINO, P. y ANTÚNEZ, K., 2019. Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Scientific Reports* [en línea], vol. 9, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-019-46453-9.
- BROOKER, B.E., 1971. Flagellar attachment and detachment of *Crithidia fasciculata* to the gut wall of *Anopheles gambiae*. *Protoplasma*, vol. 73, no. 2, ISSN 0033183X. DOI 10.1007/BF01275594.
- BROWN, M.J.F., LOOSLI, R. y SCHMID-HEMPEL, P., 2000. Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* [en línea], vol. 91, no. 3, ISSN 0030-1299. DOI 10.1034/j.1600-0706.2000.910302.x.
- BRUCE KREJČÍ, A., VOTÝPKOVÁ, K., LUKEŠ, J. y VOTÝPKA, J., 2023. *Varroa destructor*. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 39, no. 6, ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2023.03.009.

- BUDGE, G.E., ADAMS, I., THWAITES, R., PIETRAVALLE, S., DREW, G.C., HURST, G.D.D., TOMKIES, V., BOONHAM, N. y BROWN, M., 2016. Identifying bacterial predictors of honey bee health. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 141, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2016.11.003.
- BUENDÍA-ABAD, M., 2022. Patogenicidad y virulencia de *Crithidia mellificae* y *Lotmaria passim* y nueva descripción del morfotipo haptomona en *Apis mellifera iberiensis*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- BUENDÍA-ABAD, M., GARCÍA-PALENCIA, P., DE PABLOS, L.M., ALUNDA, J.M., OSUNA, A., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2022a. First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut. *International Journal for Parasitology* [en línea], vol. 52, no. 1, ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2021.06.005.
- BUENDÍA-ABAD, M., GARCÍA-PALENCIA, P., DE PABLOS, L.M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2022b. The Haptomonad Stage of *Crithidia acanthocephali* in *Apis mellifera* Hindgut. *Veterinary Sciences* [en línea], vol. 9, no. 6, ISSN 2306-7381. DOI 10.3390/vetsci9060298.
- BUENDÍA-ABAD, M., HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BARRIOS, L., MEANA, A., FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, A., OSUNA, A. y DE PABLOS, L.M., 2021. Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* [en línea], vol. 14, ISSN 22132244. DOI 10.1016/j.ijppaw.2020.12.003.
- BUENDÍA-ABAD, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2023. Trypanosomatids in honey bee colonies in Spain: A new specific qPCR method for specific quantification of *Lotmaria passim*, *Crithidia mellificae* and *Crithidia bombi*. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 201, no. October, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2023.108004.
- BUENDÍA-ABAD, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., ORNOSA, C., BARRIOS, L., BARTOLOMÉ, C. y HIGES, M., 2018. Epidemiological study of honeybee pathogens in Europe: The results of Castilla-La Mancha (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research* [en línea], vol. 16, no. 2, ISSN 2171-9292. DOI 10.5424/sjar/2018162-11474.
- BURRI, L., WILLIAMS, B.A.P., BURSAC, D., LITHGOW, T. y KEELING, P.J., 2006. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 103, no. 43, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.0604109103.

- CABIROL, A., SCHAFER, J., NEUSCHWANDER, N., KESNER, L., LIBERTI, J. y ENGEL, P., 2023. A defined community of core gut microbiota members promotes cognitive performance in honey bees [en línea]. DOI 10.1101/2023.01.03.522593.
- CAI, S.-B., WU, G., DONG, Z.-X., LIN, L.-B., GUO, J. y ZHANG, Q.-L., 2022. Colonization dynamics of the gut flora in western honey bee workers within 7-day post-emergence. *Apidologie* [en línea], vol. 53, no. 4, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-022-00934-5.
- CALATAYUD-VERNICH, P., CALATAYUD, F., SIMÓ, E. y PICÓ, Y., 2018. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution* [en línea], vol. 241, ISSN 02697491. DOI 10.1016/j.envpol.2018.05.062.
- CALDERONE, N.W. y KUENEN, L.P.S., 2003. Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping. *Apidologie* [en línea], vol. 34, no. 6, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:2003054.
- CALLEGARI, M., CROTTI, E., FUSI, M., MARASCO, R., GONELLA, E., DE NONI, I., ROMANO, D., BORIN, S., TSIAMIS, G., CHERIF, A., ALMA, A. y DAFFONCHIO, D., 2021. Compartmentalization of bacterial and fungal microbiomes in the gut of adult honeybees. *npj Biofilms and Microbiomes* [en línea], vol. 7, no. 1, ISSN 2055-5008. DOI 10.1038/s41522-021-00212-9.
- CARIVEAU, D.P., ELIJAH POWELL, J., KOCH, H., WINFREE, R. y MORAN, N.A., 2014. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME Journal* [en línea], vol. 8, no. 12, ISSN 1751-7362. DOI 10.1038/ismej.2014.68.
- CARREIRA DE PAULA, J., GARCÍA OLMEDO, P., GÓMEZ-MORACHO, T., BUENDÍA-ABAD, M., HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., OSUNA, A. y DE PABLOS, L.M., 2024. Promastigote EPS secretion and haptomonad biofilm formation as evolutionary adaptations of trypanosomatid parasites for colonizing honeybee hosts. *npj Biofilms and Microbiomes* [en línea], vol. 10, no. 1, ISSN 2055-5008. DOI 10.1038/s41522-024-00492-x.
- CASTELLI, L., BRANCHICCELA, B., GARRIDO, M., INVERNIZZI, C., PORRINI, M., ROMERO, H., SANTOS, E., ZUNINO, P. y ANTÚNEZ, K., 2020. Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 80, no. 4, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-020-01538-1.

- CASTELLI, L., BRANCHICCELA, B., INVERNIZZI, C., TOMASCO, I., BASUALDO, M., RODRIGUEZ, M., ZUNINO, P. y ANTÚNEZ, K., 2019. Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 160, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2018.11.004.
- CASTELLI, L., BRANCHICCELA, B., ROMERO, H., ZUNINO, P. y ANTÚNEZ, K., 2022. Seasonal Dynamics of the Honey Bee Gut Microbiota in Colonies Under Subtropical Climate. *Microbial Ecology*, vol. 83, no. 2, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-021-01756-1.
- CAVIGLI, I., DAUGHENBAUGH, K.F., MARTIN, M., LERCH, M., BANNER, K., GARCIA, E., BRUTSCHER, L.M. y FLENNIKEN, M.L., 2016. Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie* [en línea], vol. 47, no. 2, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-015-0395-5.
- CEPERO, A., RAVOET, J., GÓMEZ-MORACHO, T., BERNAL, J.L., DEL NOZAL, M.J., BARTOLOMÉ, C., MASIDE, X., MEANA, A., GONZÁLEZ-PORTO, A. V., DE GRAAF, D.C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2014. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Research Notes* [en línea], vol. 7, no. 1, ISSN 1756-0500. DOI 10.1186/1756-0500-7-649.
- CHAIMANEE, V., CHANTAWANNAKUL, P., CHEN, Y., EVANS, J.D. y PETTIS, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* [en línea], vol. 58, no. 8, ISSN 00221910. DOI 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016.
- CHAIMANEE, V., CHANTAWANNAKUL, P., CHEN, Y., EVANS, J.D. y PETTIS, J.S., 2014. Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* [en línea], vol. 45, no. 4, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-013-0258-x.
- CHAIMANEE, V., WARRIT, N. y CHANTAWANNAKUL, P., 2010. Infections of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 105, no. 2, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2010.06.005.
- CHAPMAN, R.F., 1998. *The Insects: structure and function*. Cambridge University Press. ISBN 978-0-340-26453-9.
- CHARISTOS, L., PARASHOS, N. y HATJINA, F., 2015. Long term effects of a food supplement HiveAlive™ on honey bee colony strength and *Nosema ceranae* spore

## Referencias Bibliográficas

- counts. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 54, no. 5, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2016.1189231.
- CHEMUROT, M., DE SMET, L., BRUNAIN, M., DE RYCKE, R. y DE GRAAF, D.C., 2017. *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. *European Journal of Protistology* [en línea], vol. 61, ISSN 09324739. DOI 10.1016/j.ejop.2017.07.002.
- CHEN, Y., EVANS, J. y FELDLAUFER, M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 92, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2006.03.010.
- CHEN, Y.P. y SIEDE, R., 2007. Honey Bee Viruses. *Encyclopedia of Virology* [en línea]. S.l.: Elsevier, pp. 33-80. vol. 70.
- CILIA, G., GARRIDO, C., BONETTO, M., TESORIERO, D. y NANETTI, A., 2020. Effect of Api-Bioxal® and ApiHerb® Treatments against *Nosema ceranae* Infection in *Apis mellifera* Investigated by Two qPCR Methods. *Veterinary Sciences* [en línea], vol. 7, no. 3, ISSN 2306-7381. DOI 10.3390/vetsci7030125.
- CORBY-HARRIS, V., MAES, P. y ANDERSON, K.E., 2014. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. En: N.M. GERARDO (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 9, no. 4, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0095056.
- CORBY-HARRIS, V., SNYDER, L., MEADOR, C.A.D., NALDO, R., MOTT, B. y ANDERSON, K.E., 2016. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology* [en línea], vol. 109, no. 2, ISSN 0022-0493. DOI 10.1093/jee/tow012.
- CORBY-HARRIS, V., SNYDER, L.A., SCHWAN, M.R., MAES, P., MCFREDERICK, Q.S. y ANDERSON, K.E., 2014. Origin and Effect of Alpha 2.2 *Acetobacteraceae* in Honey Bee Larvae and Description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. En: H.L. DRAKE (ed.), *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], vol. 80, no. 24, ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.02043-14.
- CORNMAN, R.S., CHEN, Y.P., SCHATZ, M.C., STREET, C., ZHAO, Y., DESANY, B., EGHOLM, M., HUTCHISON, S., PETTIS, J.S., LIPKIN, W.I. y EVANS, J.D., 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, vol. 5, no. 6, ISSN 15537366. DOI 10.1371/journal.ppat.1000466.

- CORNMAN, R.S., SCHATZ, M.C., JOHNSTON, J.S., CHEN, Y.-P., PETTIS, J., HUNT, G., BOURGEOIS, L., ELSIK, C., ANDERSON, D., GROZINGER, C.M. y EVANS, J.D., 2010. Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*. BMC Genomics [en línea], vol. 11, no. 1, ISSN 1471-2164. DOI 10.1186/1471-2164-11-602.
- CORNMAN, R.S., TARPY, D.R., CHEN, Y., JEFFREYS, L., LOPEZ, D., PETTIS, J.S., VANENGELSDORP, D. y EVANS, J.D., 2012. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. En: S.K. HIGHLANDER (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 7, no. 8, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0043562.
- COX-FOSTER, D.L., CONLAN, S., HOLMES, E.C., PALACIOS, G., EVANS, J.D., MORAN, N.A., QUAN, P.-L., BRIESE, T., HORNIG, M., GEISER, D.M., MARTINSON, V., VANENGELSDORP, D., KALKSTEIN, A.L., DRYSDALE, A., HUI, J., ZHAI, J., CUI, L., HUTCHISON, S.K., SIMONS, J.F., EGHOLM, M., PETTIS, J.S. y LIPKIN, W.I., 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. Science [en línea], vol. 318, no. 5848, ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.1146498.
- CRAILSHEIM, K., 1988. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Journal of Insect Physiology [en línea], vol. 34, no. 9, ISSN 00221910. DOI 10.1016/0022-1910(88)90117-5.
- CRAILSHEIM, K., 1990. The protein balance of the honey bee worker. Apidologie [en línea], vol. 21, no. 5, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:19900504.
- CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L.H.W., HRASSNIGG, N., BÜHLMANN, G., BROSCHE, U., GMEINBAUER, R. y SCHÖFFMANN, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. Journal of Insect Physiology [en línea], vol. 38, no. 6, ISSN 00221910. DOI 10.1016/0022-1910(92)90117-V.
- D'ALVISE, P., BÖHME, F., CODREA, M.C., SEITZ, A., NAHNSEN, S., BINZER, M., ROSENKRANZ, P. y HASSELMANN, M., 2018. The impact of winter feed type on intestinal microbiota and parasites in honey bees. Apidologie [en línea], vol. 49, no. 2, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-017-0551-1.
- DADE, H.A., 1994. Anatomy and Dissection of the Honey Bee. International Bee Research Association. ISBN 978-0860982142.
- DAINAT, B., EVANS, J.D., CHEN, Y.P., GAUTHIER, L. y NEUMANN, P., 2012. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. En: P. V. AGUILAR (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 7, no. 2, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0032151.

- DALENBERG, H., MAES, P., MOTT, B., ANDERSON, K.E. y SPIVAK, M., 2020. Propolis Envelope Promotes Beneficial Bacteria in the Honey Bee (*Apis mellifera*) Mouthpart Microbiome. *Insects* [en línea], vol. 11, no. 7, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects11070453.
- DANNER, N., KELLER, A., HÄRTEL, S. y STEFFAN-DEWENTER, I., 2017. Honey bee foraging ecology: Season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. *PLoS ONE*, vol. 12, no. 8, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0183716.
- DE LA RÚA, P., JIMÉNEZ, Y., GALIÁN, J. y SERRANO, J., 2004. Evaluation of the biodiversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from eastern Spain. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 43, no. 4, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2004.11101130.
- DE MIRANDA, J.R., CORDONI, G. y BUDGE, G., 2010. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 103, no. SUPPL. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2009.06.014.
- DE OLIVEIRA, A.H., SOUZA, A.M. da C., DE RESENDE, M.T.C.S., CARNEIRO, L.S., DE OLIVEIRA, J.F., SERRA, R.S. y SERRÃO, J.E., 2023. The peritrophic matrix delays *Nosema ceranae* infection in the honey bee *Apis mellifera* midgut. *Physiological Entomology* [en línea], vol. 48, no. 2-3, ISSN 0307-6962. DOI 10.1111/phen.12402.
- DEBOUTTE, W., BELLER, L., YINDA, C.K., MAES, P., DE GRAAF, D.C. y MATTHIJNSSENS, J., 2020. Honey-bee-associated prokaryotic viral communities reveal wide viral diversity and a profound metabolic coding potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 117, no. 19, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1921859117.
- DI PASQUALE, G., ALAUX, C., CONTE, Y. Le, ODOUX, J.F., PIOZ, M., VAISSIÈRE, B.E., BELZUNCES, L.P. y DECOURTYE, A., 2016. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLoS ONE*, vol. 11, no. 9, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0162818.
- DIETEMANN, V., PFLUGFELDER, J., ANDERSON, D., CHARRIÈRE, J.-D., CHEJANOVSKY, N., DAINAT, B., DE MIRANDA, J., DELAPLANE, K., DILLIER, F.-X., FUCH, S., GALLMANN, P., GAUTHIER, L., IMDORF, A., KOENIGER, N., KRALJ, J., MEIKLE, W., PETTIS, J., ROSENKRANZ, P., SAMMATARO, D., SMITH, D., YAÑEZ, O. y NEUMANN, P., 2012. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural*

- Research [en línea], vol. 51, no. 1, ISSN 0021-8839. DOI 10.3896/IBRA.1.51.1.15.
- DOCAMPO, R., DE SOUZA, W., MIRANDA, K., ROHLOFF, P. y MORENO, S.N.J., 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* [en línea], vol. 3, no. 3, ISSN 1740-1526. DOI 10.1038/nrmicro1097.
- DÖKE, M.A., FRAZIER, M. y GROZINGER, C.M., 2015. Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science* [en línea], vol. 10, ISSN 22145745. DOI 10.1016/j.cois.2015.05.014.
- DONG, Z.-X., LI, H.-Y., CHEN, Y.-F., WANG, F., DENG, X.-Y., LIN, L.-B., ZHANG, Q.-L., LI, J.-L. y GUO, J., 2020. Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. *Microbiological Research* [en línea], vol. 231, ISSN 09445013. DOI 10.1016/j.micres.2019.126370.
- DONKERSLEY, P., RHODES, G., PICKUP, R.W., JONES, K.C. y WILSON, K., 2018. Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecology and Evolution* [en línea], vol. 8, no. 10, ISSN 2045-7758. DOI 10.1002/ece3.3999.
- DONZÉ, G. y GUERIN, P.M., 1994. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology* [en línea], vol. 34, no. 5, ISSN 0340-5443. DOI 10.1007/BF00197001.
- DOSCH, C., MANIGK, A., STREICHER, T., TEHEL, A., PAXTON, R.J. y TRAGUST, S., 2021. The gut microbiota can provide viral tolerance in the honey bee. *Microorganisms*, vol. 9, no. 4, ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms9040871.
- DREW, G.C., BUDGE, G.E., FROST, C.L., NEUMANN, P., SIOZIOS, S., YAÑEZ, O. y HURST, G.D.D., 2021. Transitions in symbiosis: evidence for environmental acquisition and social transmission within a clade of heritable symbionts. *The ISME Journal* [en línea], vol. 15, no. 10, ISSN 1751-7362. DOI 10.1038/s41396-021-00977-z.
- DUAY, P., DE JONG, D. y ENGELS, W., 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honeybee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*, vol. 1, no. 3, ISSN 16765680.
- DUQUESNE, V., DELCONT, A., COUGOULE, N., CASTILLO, C., CVETKOVA, S., GRAAF, D.C. De, FORSGREN, E., GRANATO, A. y GURGULOVA, K.,

2017. An inter-laboratory comparison of molecular methods for the identification of *Nosema* species in honeybee samples. Euroreference, vol. 3, no. December, DOI 10.5281/zenodo.1172008.
- DURRER, S. y SCHMID-HEMPEL, P., 1994. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences [en línea], vol. 258, no. 1353, ISSN 0962-8452. DOI 10.1098/rspb.1994.0176.
- DUSSAUBAT, C., BRUNET, J.-L., HIGES, M., COLBOURNE, J.K., LOPEZ, J., CHOI, J.-H., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., COUSIN, M., MCDONNELL, C., BONNET, M., BELZUNCES, L.P., MORITZ, R.F.A., LE CONTE, Y. y ALAUX, C., 2012. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. En: L.A. MOREIRA (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 7, no. 5, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0037017.
- DUSSAUBAT, C., MAISONNASSE, A., CRAUSER, D., BESLAY, D., COSTAGLIOLA, G., SOUBEYRAND, S., KRETZCHMAR, A. y LE CONTE, Y., 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 113, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2013.01.002.
- EIRI, D.M., SUWANNAPONG, G., ENDLER, M. y NIEH, J.C., 2015. *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. En: G. FAVIA (ed.), PLOS ONE [en línea], vol. 10, no. 5, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0126330.
- EL AGREBI, N., TRAYNOR, K., WILMART, O., TOSI, S., LEINARTZ, L., DANNEELS, E., DE GRAAF, D.C. y SAEGERMAN, C., 2020. Pesticide and veterinary drug residues in Belgian beeswax: Occurrence, toxicity, and risk to honey bees. Science of The Total Environment [en línea], vol. 745, ISSN 00489697. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.141036.
- EL KHOURY, S., GIOVENAZZO, P. y DEROME, N., 2022. Endogenous Honeybee Gut Microbiota Metabolize the Pesticide Clothianidin. Microorganisms [en línea], vol. 10, no. 3, ISSN 2076-2607. DOI 10.3390/microorganisms10030493.
- EL KHOURY, S., ROUSSEAU, A., LECOEUR, A., CHEAIB, B., BOUSLAMA, S., MERCIER, P.L., DEMEY, V., CASTEX, M., GIOVENAZZO, P. y DEROME, N., 2018. Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administrating either endogenous or allochthonous gut microbiota strains.

- Frontiers in Ecology and Evolution, vol. 6, no. MAY, ISSN 2296701X. DOI 10.3389/fevo.2018.00058.
- ELLEGAARD, K.M., SUENAMI, S., MIYAZAKI, R. y ENGEL, P., 2020. Vast Differences in Strain-Level Diversity in the Gut Microbiota of Two Closely Related Honey Bee Species. *Current Biology* [en línea], vol. 30, no. 13, ISSN 09609822. DOI 10.1016/j.cub.2020.04.070.
- ELLEGAARD, K.M., TAMARIT, D., JAVELIND, E., OLOFSSON, T.C., ANDERSSON, S.G.E. y VÁSQUEZ, A., 2015. Extensive intra-phylotype diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. *BMC Genomics* [en línea], vol. 16, no. 1, ISSN 1471-2164. DOI 10.1186/s12864-015-1476-6.
- EMERY, O., SCHMIDT, K. y ENGEL, P., 2017. Immune system stimulation by the gut symbiont *Frischella perrara* in the honey bee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* [en línea], vol. 26, no. 9, ISSN 0962-1083. DOI 10.1111/mec.14058.
- ENDO, A., IRISAWA, T., FUTAGAWA-ENDO, Y., TAKANO, K., DU TOIT, M., OKADA, S. y DICKS, L.M.T., 2012. Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 62, no. 3, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijs.0.031054-0.
- ENGEL, P., BARTLETT, K.D. y MORAN, N.A., 2015. The Bacterium *Frischella perrara* Causes Scab Formation in the Gut of its Honeybee Host. En: M.J. MCFALL-NGAI (ed.), *mBio* [en línea], vol. 6, no. 3, ISSN 2161-2129. DOI 10.1128/mBio.00193-15.
- ENGEL, P., MARTINSON, V.G. y MORAN, N.A., 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [en línea], vol. 109, no. 27, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1202970109.
- ENGEL, P. y MORAN, N.A., 2013a. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes*, vol. 4, no. 1, ISSN 19490984. DOI 10.4161/gmic.22517.
- ENGEL, P. y MORAN, N.A., 2013b. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* [en línea], vol. 37, no. 5, ISSN 1574-6976. DOI 10.1111/1574-6976.12025.
- ENGEL, P., SALZBURGER, W., LIESCH, M., CHANG, C.-C., MARUYAMA, S., LANZ, C., CALTEAU, A., LAJUS, A., MÉDIGUE, C., SCHUSTER, S.C. y DEHIO, C., 2011. Parallel Evolution of a Type IV Secretion System in Radiating

## Referencias Bibliográficas

- Lineages of the Host-Restricted Bacterial Pathogen *Bartonella*. En: D.S. GUTTMAN (ed.), PLoS Genetics [en línea], vol. 7, no. 2, ISSN 1553-7404. DOI 10.1371/journal.pgen.1001296.
- ERLANDSON, M.A., TOPRAK, U. y HEGEDUS, D.D., 2019. Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions. Journal of Insect Physiology [en línea], vol. 117, no. June, ISSN 00221910. DOI 10.1016/j.jinsphys.2019.103894.
- EUROPEAN COMMISSION, 2021. Commission implementing regulation (EU) 2021/620. [en línea]. Bruselas.
- FENOY, S., RUEDA, C., HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y DEL AGUILA, C., 2009. High-Level Resistance of *Nosema ceranae*, a Parasite of the Honeybee, to Temperature and Desiccation. Applied and Environmental Microbiology [en línea], vol. 75, no. 21, ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.01025-09.
- FERREIRA, H., HENRIQUES, D., NEVES, C.J., MACHADO, C.A.S., AZEVEDO, J.C., FRANCOY, T.M. y PINTO, M.A., 2020. Historical and contemporaneous human-mediated processes left a strong genetic signature on honey bee populations from the Macaronesian archipelago of the Azores. Apidologie [en línea], vol. 51, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-019-00720-w.
- FIDALGO, L.M. y GILLE, L., 2011. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. Pharmaceutical Research [en línea], vol. 28, no. 11, ISSN 0724-8741. DOI 10.1007/s11095-011-0586-3.
- FIGUEROA, L.L., GRINCAVITCH, C. y MCART, S.H., 2021. *Crithidia bombi* can infect two solitary bee species while host survivorship depends on diet. Parasitology [en línea], vol. 148, no. 4, ISSN 0031-1820. DOI 10.1017/S0031182020002218.
- FLEITES-AYIL, F.A., QUEZADA-EUÁN, J.J.G. y MEDINA-MEDINA, L.A., 2018. Onset of foraging and lifespan of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) infected with different levels of *Nosema ceranae* spores in Neotropical Mexico. Apidologie [en línea], vol. 49, no. 6, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-018-0602-2.
- FOLLY, A.J., KOCH, H., STEVENSON, P.C. y BROWN, M.J.F., 2017. Larvae act as a transient transmission hub for the prevalent bumblebee parasite *Crithidia bombi*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 148, no. May, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2017.06.001.
- FORMATO, G., RIVERA-GOMIS, J., BUBNIC, J., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MILITO, M., CROPPI, S. y HIGES, M., 2022. Nosemosis Prevention and Control. Applied Sciences [en línea], vol. 12, no. 2, ISSN 2076-3417. DOI 10.3390/app12020783.

- FRIES, I., 1988. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* in the ventriculus of honey bee. *Apidologie* [en línea], vol. 19, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:19880310.
- FRIES, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 103, no. SUPPL. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2009.06.017.
- FRIES, I., FENG, F., DA SILVA, A., SLEMENDA, S.B. y PIENIAZEK, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* [en línea], vol. 32, no. 3, ISSN 09324739. DOI 10.1016/S0932-4739(96)80059-9.
- FRIES, I., CHAUZAT, M.P., CHEN, Y.P., DOUBLET, V., GENERSCH, E., GISDER, S., HIGES, M., MCMAHON, D.P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., NATSOPOULOU, M., PAXTON, R.J., TANNER, G., WEBSTER, T.C. y WILLIAMS, G.R., 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, vol. 52, no. 1, ISSN 00218839. DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.14.
- FULLER, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* [en línea], vol. 66, no. 5, ISSN 0021-8847. DOI 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x.
- GAGE, S.L., KRAMER, C., CALLE, S., CARROLL, M., HEIEN, M. y DEGRANDI-HOFFMAN, G., 2018. *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, vol. 221, no. 4, ISSN 00220949. DOI 10.1242/jeb.161489.
- GAGGIÀ, F., JAKOBSEN, R.R., ALBERONI, D., BAFFONI, L., CUTAJAR, S., MIFSUD, D., NIELSEN, D.S. y DI GIOIA, D., 2023. Environment or genetic isolation? An atypical intestinal microbiota in the Maltese honey bee *Apis mellifera* *spp. ruttneri*. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 14, no. February, ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2023.1127717.
- GALLAI, N., SALLES, J.-M., SETTELE, J. y VAISSIÈRE, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* [en línea], vol. 68, no. 3, ISSN 09218009. DOI 10.1016/j.ecolecon.2008.06.014.

- GAREDEW, A., SCHMOLZ, E. y LAMPRECHT, I., 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* [en línea], vol. 35, no. 4, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:2004032.
- GARRIDO, P.M., PORRINI, M.P., ANTÚNEZ, K., BRANCHICCELA, B., MARTÍNEZ-NOËL, G.M.A., ZUNINO, P., SALERNO, G., EGUARAS, M.J. y IENO, E., 2016. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Veterinary Research* [en línea], vol. 47, no. 1, ISSN 1297-9716. DOI 10.1186/s13567-016-0335-z.
- GELDERT, C., ABDO, Z., STEWART, J.E. y H.S., A., 2021. Dietary supplementation with phytochemicals improves diversity and abundance of honey bee gut microbiota. *Journal of Applied Microbiology* [en línea], vol. 130, no. 5, ISSN 1364-5072. DOI 10.1111/jam.14897.
- GIBSON, G.R. y ROBERFROID, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition* [en línea], vol. 125, no. 6, ISSN 00223166. DOI 10.1093/jn/125.6.1401.
- GIERSCH, T., BERG, T., GALEA, F. y HORNITZKY, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* [en línea], vol. 40, no. 2, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido/2008065.
- GILLOTT, C., 1995. *Entomology* [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands. ISBN 978-0-306-44967-3.
- GISDER, S., MÖCKEL, N., LINDE, A. y GENERSCH, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 13, no. 2, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x.
- GISDER, S., SCHÜLER, V., HORCHLER, L.L., GROTH, D. y GENERSCH, E., 2017. Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en línea], vol. 7, no. JUL, ISSN 2235-2988. DOI 10.3389/fcimb.2017.00301.
- GOBIERNO DE CHILE, 2024. Resolución 2723 EXENTA. [en línea]. Santiago, Chile.
- GOBLIRSCH, M., HUANG, Z.Y. y SPIVAK, M., 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. En:

- G. V. AMDAM (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 8, no. 3, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0058165.
- GÓMEZ-MORACHO, T., BUENDÍA-ABAD, M., BENITO, M., GARCÍA-PALENCIA, P., BARRIOS, L., BARTOLOMÉ, C., MASIDE, X., MEANA, A., JIMÉNEZ-ANTÓN, M.D., OLÍAS-MOLERO, A.I., ALUNDA, J.M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2020. Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* on honey bees. International Journal for Parasitology [en línea], vol. 50, no. 13, ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2020.06.009.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J., DAVIES, T.G.E., FIELD, L.M., KENNEDY, P.J. y WILLIAMSON, M.S., 2013. An Amino Acid Substitution (L925V) Associated with Resistance to Pyrethroids in *Varroa destructor*. En: G. SMAGGHE (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 8, no. 12, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0082941.
- GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C. y ROTHERAY, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science [en línea], vol. 347, no. 6229, ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.1255957.
- GRAYSTOCK, P., GOULSON, D. y HUGHES, W.O.H., 2014. The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. PeerJ [en línea], vol. 2, no. 1, ISSN 2167-8359. DOI 10.7717/peerj.522.
- GRAYSTOCK, P., GOULSON, D. y HUGHES, W.O.H., 2015. Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences [en línea], vol. 282, no. 1813, ISSN 0962-8452. DOI 10.1098/rspb.2015.1371.
- GRIMALDI, D. y ENGEL, M.S., 2005. Evolution of the Insects [en línea]. S.I.: Cambridge University Press. ISBN 9780521821490.
- GUERRERO-MOLINA, C., CORREA-BENÍTEZ, A., HAMIDUZZAMAN, M.M. y GUZMAN-NOVOA, E., 2016. *Nosema ceranae* is an old resident of honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Mexico, causing infection levels of one million spores per bee or higher during summer and fall. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 141, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2016.11.001.
- GUO, J., WU, J., CHEN, Y., EVANS, J.D., DAI, R., LUO, W. y LI, J., 2015. Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees, *Apis cerana*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 127, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2015.03.010.

- HADDAD, N.J., 2014. First Detection of *Nosema ceranae* in Jordan. *European Scientific Journal*, vol. 10, no. 33, ISSN: 1857 – 7881.
- HALL, R.J., PRAGERT, H., PHIRI, B.J., FAN, Q.-H., LI, X., PARNELL, A., STANISLAWEK, W.L., MCDONALD, C.M., HA, H.J., MCDONALD, W. y TAYLOR, M., 2021. Apicultural practice and disease prevalence in *Apis mellifera*, New Zealand: a longitudinal study. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 60, no. 5, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2021.1936422.
- HALL, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999.
- HALLIDAY, C., DE CASTRO-NETO, A., ALCANTARA, C.L., CUNHA-E-SILVA, N.L., VAUGHAN, S. y SUNTER, J.D., 2021. Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 37, no. 4, ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2020.11.005.
- HAMDI, C., BALLOI, A., ESSANAA, J., CROTTI, E., GONELLA, E., RADDADI, N., RICCI, I., BOUDABOUS, A., BORIN, S., MANINO, A., BANDI, C., ALMA, A., DAFFONCHIO, D. y CHERIF, A., 2011. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology* [en línea], vol. 135, no. 7, ISSN 09312048. DOI 10.1111/j.1439-0418.2010.01609.x.
- HAMMER, T.J., DICKERSON, J.C. y FIERER, N., 2015. Evidence-based recommendations on storing and handling specimens for analyses of insect microbiota. *PeerJ* [en línea], vol. 3, no. 8, ISSN 2167-8359. DOI 10.7717/peerj.1190.
- HAN, B., TAKVORIAN, P.M. y WEISS, L.M., 2020. Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 11, no. February, ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2020.00172.
- HAN, B. y WEISS, L.M., 2017. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *The Fungal Kingdom* [en línea]. Washington, DC, USA: ASM Press, pp. 97-113. ISBN 9781683670827.
- HAN, B., WU, J., WEI, Q., LIU, F., CUI, L., RUEPPELL, O. y XU, S., 2024. Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. *Nature Communications* [en línea], vol. 15, no. 1, ISSN 2041-1723. DOI 10.1038/s41467-024-44915-x.
- HANSON, W.L. y MCGHEE, R.B., 1963. Experimental Infection of the Hemipteron *Oncopeltus fasciatus* with Trypanosomatidae Isolated from other Hosts. *The Journal of Protozoology* [en línea], vol. 10, no. 2, ISSN 0022-3921. DOI 10.1111/j.1550-7408.1963.tb01668.x.

- HÄUSSERMANN, C.K., GIACOBINO, A., MUNZ, R., ZIEGELMANN, B., PALACIO, M.A. y ROSENKRANZ, P., 2019. Reproductive parameters of female *Varroa destructor* and the impact of mating in worker brood of *Apis mellifera*. *Apidologie* [en línea], vol. 51, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-019-00713-9.
- HÄUSSERMANN, C.K., ZIEGELMANN, B. y ROSENKRANZ, P., 2016. Spermatozoa capacitation in female *Varroa destructor* and its influence on the timing and success of female reproduction. *Experimental and Applied Acarology* [en línea], vol. 69, no. 4, ISSN 0168-8162. DOI 10.1007/s10493-016-0051-4.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y MEANA, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* [en línea], vol. 41, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido/2010019.
- HIGES, M., GARCÍA-PALENCIA, P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y MEANA, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 94, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2006.11.001.
- HIGES, M., GARCÍA-PALENCIA, P., URBIETA, A., NANETTI, A. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2020a. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Pathology* [en línea], vol. 57, no. 1, ISSN 0300-9858. DOI 10.1177/0300985819864302.
- HIGES, M., GÓMEZ-MORACHO, T., RODRIGUEZ-GARCÍA, C., BOTÍAS, C. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2014. Preliminary effect of an experimental treatment with “Nozevit®”, (a phyto-pharmacological preparation) for *Nosema ceranae* control. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 53, no. 4, ISSN 0021-8839. DOI 10.3896/IBRA.1.53.4.03.
- HIGES, M., JUARRANZ, Á., DIAS-ALMEIDA, J., LUCENA, S., BOTÍAS, C., MEANA, A., GARCÍA-PALENCIA, P. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2013a. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports* [en línea], vol. 5, no. 4, ISSN 1758-2229. DOI 10.1111/1758-2229.12059.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., GARRIDO-BAILÓN, E., GARCÍA-PALENCIA, P. y MEANA, A., 2008a. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 97, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2007.06.002.

- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S. y GONZÁLEZ-CABRERA, J., 2020b. Assessing the resistance to acaricides in *Varroa destructor* from several Spanish locations. *Parasitology Research* [en línea], vol. 119, no. 11, ISSN 0932-0113. DOI 10.1007/s00436-020-06879-x.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., BAILÓN, E.G., GONZÁLEZ-PORTO, A. V., BARRIOS, L., DEL NOZAL, M.J., BERNAL, J.L., JIMÉNEZ, J.J., PALENCIA, P.G. y MEANA, A., 2008c. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 10, no. 10, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., GARRIDO-BAILÓN, E., BOTÍAS, C., GARCÍA-PALENCIA, P. y MEANA, A., 2008b. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology* [en línea], vol. 10, no. 5, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2007.01548.x.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., GARRIDO-BAILÓN, E., GONZÁLEZ-PORTO, A. V., GARCÍA-PALENCIA, P., MEANA, A., DEL NOZAL, M.J., MAYO, R. y BERNAL, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* [en línea], vol. 1, no. 2, ISSN 1758-2229. DOI 10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., GARRIDO-BAILÓN, E., GONZÁLEZ-PORTO, A.V., MEANA, A., BERNAL, J.L., DEL NOZAL, M.J. y BERNAL, J., 2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* [en línea], vol. 2, no. 2, ISSN 1758-2229. DOI 10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x.
- HIGES, M., MARTÍN, R. y MEANA, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 92, no. 2, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2006.02.005
- HIGES, M., MEANA, A., BARTOLOMÉ, C., BOTÍAS, C. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2013b. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* [en línea], vol. 5, no. 1, ISSN 1758-2229. DOI 10.1111/1758-2229.12024.
- HIGES, M., NOZAL, M.J., ALVARO, A., BARRIOS, L., MEANA, A., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BERNAL, J.L. y BERNAL, J., 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection

- in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* [en línea], vol. 42, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-011-0003-2.
- HIGES, M., RODRÍGUEZ-GARCÍA, C., GÓMEZ-MORACHO, T., MEANA, A., BARTOLOMÉ, C., MASIDE, X., BARRIOS, L. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2016. Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254TM) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research* [en línea], vol. 14, no. 3, ISSN 2171-9292. DOI 10.5424/sjar/2016143-8722.
- HOLT, H.L., ARONSTEIN, K.A. y GROZINGER, C.M., 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* [en línea], vol. 14, no. 1, ISSN 1471-2164. DOI 10.1186/1471-2164-14-799.
- HOOVER, S.E. y OVINCE, L.P., 2018. Pollen Collection, Honey Production, and Pollination Services: Managing Honey Bees in an Agricultural Setting. *Journal of Economic Entomology* [en línea], vol. 111, no. 4, ISSN 0022-0493. DOI 10.1093/jee/toy125.
- HORTON, M.A., OLIVER, R. y NEWTON, I.L., 2015. No apparent correlation between honey bee forager gut microbiota and honey production. *PeerJ* [en línea], vol. 3, no. 10, ISSN 2167-8359. DOI 10.7717/peerj.1329.
- HRISTOV, P., SHUMKOVA, R., PALOVA, N. y NEOV, B., 2020. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary Sciences* [en línea], vol. 7, no. 4, ISSN 2306-7381. DOI 10.3390/vetsci7040166.
- HRONCOVA, Z., HAVLIK, J., KILLER, J., DOSKOCIL, I., TYL, J., KAMLER, M., TITERA, D., HAKL, J., MRAZEK, J., BUNESOVA, V. y RADA, V., 2015. Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. En: P. JIRAVANICHPAISAL (ed.), *PLOS ONE* [en línea], vol. 10, no. 3, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0118707.
- HU, H., BEZABIH, G., FENG, M., WEI, Q., ZHANG, X., WU, F., MENG, L., FANG, Y., HAN, B., MA, C. y LI, J., 2019. In-depth Proteome of the Hypopharyngeal Glands of Honeybee Workers Reveals Highly Activated Protein and Energy Metabolism in Priming the Secretion of Royal Jelly. *Molecular & Cellular Proteomics* [en línea], vol. 18, no. 4, ISSN 15359476. DOI 10.1074/mcp.RA118.001257.
- HUANG, Q., KRYGER, P., LE CONTE, Y. y MORITZ, R.F.A., 2012. Survival and immune response of drones of a nosemosis tolerant honey bee strain towards

- N. ceranae* infections. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 109, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2012.01.004.
- HUANG, S.K., YE, K.T., HUANG, W.F., YING, B.H., SU, X., LIN, L.H., LI, J.H., CHEN, Y.P., LI, J.L., BAO, X.L. y HU, J.Z., 2018. Influence of Feeding Type and *Nosema ceranae* Infection on the Gut Microbiota of *Apis cerana* Workers. En: A. SHADE (ed.), mSystems [en línea], vol. 3, no. 6, ISSN 2379-5077. DOI 10.1128/msystems.00177-18.
- HUANG, W.-F., BOCQUET, M., LEE, K.-C., SUNG, I.-H., JIANG, J.-H., CHEN, Y.-W. y WANG, C.-H., 2008. The comparison of rDNA spacer regions of *Nosema ceranae* isolates from different hosts and locations. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 97, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2007.07.001.
- HUANG, W.-F., JIANG, J.-H., CHEN, Y.-W. y WANG, C.-H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie [en línea], vol. 38, no. 1, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:2006054.
- HUANG, W.-F. y SOLTER, L.F., 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 113, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2013.01.001.
- HUANG, W.-F., SOLTER, L.F., YAU, P.M. y IMAI, B.S., 2013. *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. En: D.S. SCHNEIDER (ed.), PLoS Pathogens [en línea], vol. 9, no. 3, ISSN 1553-7374. DOI 10.1371/journal.ppat.1003185.
- HUBERT, J., BICIANOVA, M., LEDVINKA, O., KAMLER, M., LESTER, P.J., NESVORNA, M., KOPECKY, J. y ERBAN, T., 2017. Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. Microbial Ecology [en línea], vol. 73, no. 3, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-016-0869-7.
- HUBERT, J., ERBAN, T., KAMLER, M., KOPECKY, J., NESVORNA, M., HEJDANKOVA, S., TITERA, D., TYL, J. y ZUREK, L., 2015. Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. Journal of Applied Microbiology [en línea], vol. 119, no. 3, ISSN 13645072. DOI 10.1111/jam.12899.
- HUBERT, J., KAMLER, M., NESVORNA, M., LEDVINKA, O., KOPECKY, J. y ERBAN, T., 2016. Comparison of *Varroa destructor* and Worker Honeybee Microbiota Within Hives Indicates Shared Bacteria. Microbial Ecology [en línea], vol. 72, no. 2, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-016-0776-y.

- IFANTIDIS, M.D., 1983. Ontogenesis of the Mite *Varroa Jacobsoni* in Worker and Drone Honeybee Brood Cells. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 22, no. 3, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.1983.11100588.
- IKEDA-OHTSUBO, W., BRUGMAN, S., WARDEN, C.H., REBEL, J.M.J., FOLKERTS, G. y PIETERSE, C.M.J., 2018. How Can We Define “Optimal Microbiota?”: A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture. *Frontiers in Nutrition* [en línea], vol. 5, no. October, ISSN 2296-861X. DOI 10.3389/fnut.2018.00090.
- INVERNIZZI, C., SANTOS, E., GARCÍA, E., DANERS, G., DI LANDRO, R., SAADOUN, A. y CABRERA, C., 2011. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations. *Archivos de Zootecnia* [en línea], vol. 60, no. 232, ISSN 0004-0592. DOI 10.4321/S0004-05922011000400045.
- JABAL-URIEL, C., ALBA, C., HIGES, M., RODRÍGUEZ, J.M. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2022a. Effect of *Nosema ceranae* infection and season on the gut bacteriome composition of the European honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific Reports* [en línea], vol. 12, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-022-13337-4.
- JABAL-URIEL, C., ALBARRACÍN, V.N., CALATAYUD, J., HIGES, M. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2022b. Age and Season Effect the Timing of Adult Worker Honeybee Infection by *Nosema ceranae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en línea], vol. 11, no. January, ISSN 2235-2988. DOI 10.3389/fcimb.2021.823050.
- JABAL-URIEL, C., BARRIOS, L., BONJOUR-DALMON, A., CASPI-YONA, S., CHEJANOVSLY, N., EREZ, T., HENRIQUES, D., HIGES, M., LE CONTE, Y., LOPES, A.R., MEANA, A., PINTO, M.A., REYES-CARREÑO, M., SOROKER, V. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2022c. Epidemiology of the Microsporidium *Nosema ceranae* in Four Mediterranean Countries. *Insects* [en línea], vol. 13, no. 9, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects13090844.
- JACK, C.J., LUCAS, H.M., WEBSTER, T.C. y SAGILI, R.R., 2016. Colony Level Prevalence and Intensity of *Nosema ceranae* in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). En: J.C. NIEH (ed.), *PLOS ONE* [en línea], vol. 11, no. 9, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0163522.
- JEYAPRAKASH, A., HOY, M.A. y ALLSOPP, M.H., 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 84, no. 2, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2003.08.007.

- JOHNSON, B.R., 2010. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology* [en línea], vol. 64, no. 3, ISSN 0340-5443. DOI 10.1007/s00265-009-0874-7. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00265-009-0874-7>.
- JOJIMA, Y., MIHARA, Y., SUZUKI, S., YOKOZEKI, K., YAMANAKA, S. y FUDOU, R., 2004. *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 54, no. 6, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijs.0.02911-0.
- JONES, J.C., FRUCIANO, C., MARCHANT, J., HILDEBRAND, F., FORSLUND, S., BORK, P., ENGEL, P. y HUGHES, W. O.H., 2018. The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insectes Sociaux*, vol. 65, no. 3, ISSN 14209098. DOI 10.1007/s00040-018-0624-9.
- KAKUMANU, M.L., REEVES, A.M., ANDERSON, T.D., RODRIGUES, R.R. y WILLIAMS, M.A., 2016. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Frontiers in Microbiology* [en línea], vol. 7, no. AUG, ISSN 1664-302X. DOI 10.3389/fmicb.2016.01255.
- KANBAR, G. y ENGELS, W., 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology Research*, vol. 90, no. 5, ISSN 09320113. DOI 10.1007/s00436-003-0827-4.
- KAPHEIM, K.M., RAO, V.D., YEOMAN, C.J., WILSON, B.A., WHITE, B.A., GOLDENFELD, N. y ROBINSON, G.E., 2015. Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, vol. 10, no. 4, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0123911.
- KATHER, R., DRIJFHOUT, F.P., SHEMILT, S. y MARTIN, S.J., 2015. Evidence for Passive Chemical Camouflage in the Parasitic Mite *Varroa destructor*. *Journal of Chemical Ecology* [en línea], vol. 41, no. 2, ISSN 0098-0331. DOI 10.1007/s10886-015-0548-z.
- KAUFER, A., ELLIS, J., STARK, D. y BARRATT, J., 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors* [en línea], vol. 10, no. 1, ISSN 1756-3305. DOI 10.1186/s13071-017-2204-7.
- KAUFER, A., STARK, D. y ELLIS, J., 2020. A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. *International Journal for Parasitology* [en línea], vol. 50, no. 6-7, ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2020.03.003.

- KELLY, F.D., SANCHEZ, M.A. y LANDFEAR, S.M., 2020. Touching the Surface: Diverse Roles for the Flagellar Membrane in Kinetoplastid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 84, no. 2, ISSN 1092-2172. DOI 10.1128/mmbr.00079-19.
- KEŠNEROVÁ, L., EMERY, O., TROILO, M., LIBERTI, J., ERKOSAR, B. y ENGEL, P., 2020. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal* [en línea], vol. 14, no. 3, ISSN 1751-7362. DOI 10.1038/s41396-019-0568-8.
- KEŠNEROVÁ, L., MARS, R.A.T., ELLEGAARD, K.M., TROILO, M., SAUER, U. y ENGEL, P., 2017. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. En: D. RELMAN (ed.), *PLOS Biology* [en línea], vol. 15, no. 12, ISSN 1545-7885. DOI 10.1371/journal.pbio.2003467.
- KEŠNEROVÁ, L., MORITZ, R. y ENGEL, P., 2016. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 66, no. 1, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijsem.0.000736.
- KILLER, J., DUBNÁ, S., SEDLÁČEK, I. y ŠVEC, P., 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en línea], vol. 64, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijs.0.053033-0.
- KIM, M., KIM, W.J. y PARK, S.-J., 2023. Analyzing Gut Microbial Community in *Varroa destructor*-Infested Western Honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Microbiology and Biotechnology* [en línea], vol. 33, no. 11, ISSN 1017-7825. DOI 10.4014/jmb.2306.06040.
- KIM, O.J., 2003. Effect of Fixation Time and Freeze-thaw Cycles on the Molecular Analysis of Viral DNA. *Journal of Veterinary Science* [en línea], vol. 4, no. 2, ISSN 1229-845X. DOI 10.4142/jvs.2003.4.2.203.
- KLEE, J., BESANA, A.M., GENERSCH, E., GISDER, S., NANETTI, A., TAM, D.Q., CHINH, T.X., PUERTA, F., RUZ, J.M., KRYGER, P., MESSAGE, D., HATJINA, F., KORPELA, S., FRIES, I. y PAXTON, R.J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 96, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2007.02.014.
- KLUNGNESS, L.M. y PENG, Y.-S., 1984a. A histochemical study of pollen digestion in the alimentary canal of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect*

## Referencias Bibliográficas

- Physiology, vol. 30, no. 7, ISSN 00221910. DOI 10.1016/0022-1910(84)90077-5.
- KLUNGNESS, L.M. y PENG, Y.-S., 1984b. Scanning electron microscope observations of pollen food bolus in the alimentary canal of honeybees (*Apis mellifera* L.). Canadian Journal of Zoology [en línea], vol. 62, no. 7, ISSN 0008-4301. DOI 10.1139/z84-189.
- KOCH, H., ABROL, D.P., LI, J. y SCHMID-HEMPEL, P., 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. Molecular Ecology [en línea], vol. 22, no. 7, ISSN 0962-1083. DOI 10.1111/mec.12209.
- KOCH, H. y SCHMID-HEMPEL, P., 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. Proceedings of the National Academy of Sciences [en línea], vol. 108, no. 48, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1110474108.
- KOSKELLA, B., HALL, L.J. y METCALF, C.J.E., 2017. The microbiome beyond the horizon of ecological and evolutionary theory. Nature Ecology & Evolution [en línea], vol. 1, no. 11, ISSN 2397-334X. DOI 10.1038/s41559-017-0340-2.
- KOSTIC, A.D., HOWITT, M.R. y GARRETT, W.S., 2013. Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. Genes & Development [en línea], vol. 27, no. 7, ISSN 0890-9369. DOI 10.1101/gad.212522.112.
- KOWALLIK, V. y MIKHEYEV, A.S., 2021. Honey Bee Larval and Adult Microbiome Life Stages Are Effectively Decoupled with Vertical Transmission Overcoming Early Life Perturbations. En: N.A. MORAN y N. PUJOL (eds.), mBio [en línea], vol. 12, no. 6, ISSN 2150-7511. DOI 10.1128/mBio.02966-21.
- KRALJ, J. y FUCHS, S., 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. Apidologie [en línea], vol. 37, no. 5, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido:2006040.
- KRALJ, J. y FUCHS, S., 2010. *Nosema* spp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. Apidologie [en línea], vol. 41, no. 1, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido/2009046.
- KUENEN, L.P.S. y CALDERONE, N.W., 2000. Varroa mite infestations in elevated honey bee brood cells: Effects of context and caste. Journal of Insect Behavior, vol. 13, no. 2, ISSN 08927553. DOI 10.1023/A:1007784130228.
- KUNC, M., DOBEŠ, P., HURYCHOVÁ, J., VOJTEK, L., POIANI, S., DANIHLÍK, J., HAVLÍK, J., TITĚRA, D. y HYRŠL, P., 2019. The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for

- Biochemical Markers of Longevity. Insects [en línea], vol. 10, no. 8, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects10080244.
- KURZE, C., LE CONTE, Y., DUSSAUBAT, C., ERLER, S., KRYGER, P., LEWKOWSKI, O., MÜLLER, T., WIDDER, M. y MORITZ, R.F.A., 2015. Nosema Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis. En: W. BLENAU (ed.), PLOS ONE [en línea], vol. 10, no. 10, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0140174.
- KWONG, W.K., ENGEL, P., KOCH, H. y MORAN, N.A., 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences [en línea], vol. 111, no. 31, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1405838111.
- KWONG, W.K., MANCENIDO, A.L. y MORAN, N.A., 2014. Genome Sequences of *Lactobacillus* sp. Strains wkB8 and wkB10, Members of the Firm-5 Clade, from Honey Bee Guts. Genome Announcements [en línea], vol. 2, no. 6, ISSN 2169-8287. DOI 10.1128/genomeA.01176-14.
- KWONG, W.K., MANCENIDO, A.L. y MORAN, N.A., 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. Royal Society Open Science [en línea], vol. 4, no. 2, ISSN 2054-5703. DOI 10.1098/rsos.170003.
- KWONG, W.K., MEDINA, L.A., KOCH, H., SING, K.-W., SOH, E.J.Y., ASCHER, J.S., JAFFÉ, R. y MORAN, N.A., 2017. Dynamic microbiome evolution in social bees. Science Advances [en línea], vol. 3, no. 3, ISSN 2375-2548. DOI 10.1126/sciadv.1600513.
- KWONG, W.K. y MORAN, N.A., 2013. Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order 'Enterobacteriales' of the Gammaproteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [en línea], vol. 63, no. Pt\_6, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijs.0.044875-0.
- KWONG, W.K. y MORAN, N.A., 2015. Evolution of host specialization in gut microbes: the bee gut as a model. Gut Microbes [en línea], vol. 6, no. 3, ISSN 1949-0976. DOI 10.1080/19490976.2015.1047129.
- KWONG, W.K. y MORAN, N.A., 2016a. *Apibacter adventoris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from honey bees. International

## Referencias Bibliográficas

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [en línea], vol. 66, no. 3, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijsem.0.000882.
- KWONG, W.K. y MORAN, N.A., 2016b. Gut microbial communities of social bees. Nature Reviews Microbiology [en línea], vol. 14, no. 6, ISSN 1740-1526. DOI 10.1038/nrmicro.2016.43.
- KWONG, W.K., ZHENG, H. y MORAN, N.A., 2017. Convergent evolution of a modified, acetate-driven TCA cycle in bacteria. Nature Microbiology [en línea], vol. 2, no. 7, ISSN 2058-5276. DOI 10.1038/nmicrobiol.2017.67.
- LALHMANGAIHI, R., GHATAK, S., LAHA, R., GURUSUBRAMANIAN, G. y SENTHIL KUMAR, N., 2014. Protocol for optimal quality and quantity pollen DNA isolation from Honey samples. Journal of Biomolecular Techniques, vol. 25, no. 4, ISSN 19434731. DOI 10.7171/jbt.14-2504-001.
- LANDFEAR, S.M. y IGNATUSHCHENKO, M., 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. Molecular and Biochemical Parasitology [en línea], vol. 115, no. 1, ISSN 01666851. DOI 10.1016/S0166-6851(01)00262-6..
- LANGRIDGE, D.F. y MCGHEE, R.B., 1967. *Crithidia mellificae* n. sp. an Acidophilic Trypanosomatid of the Honey Bee *Apis mellifera*. The Journal of Protozoology [en línea], vol. 14, no. 3, ISSN 0022-3921. DOI 10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x.
- LAU, E., MACCARO, J., MCFREDERICK, Q.S. y NIEH, J.C., 2024. Exploring the interactions between *Nosema ceranae* infection and the honey bee gut microbiome. Scientific Reports [en línea], vol. 14, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-024-67796-y.
- LE CONTE, Y., ELLIS, M. y RITTER, W., 2010. *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the colony losses? Apidologie [en línea], vol. 41, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1051/apido/2010017.
- LE CONTE, Y. y NAVAJAS, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Revue Scientifique et Technique de l'OIE [en línea], vol. 27, no. 2, ISSN 0253-1933. DOI 10.20506/rst.27.2.1819.
- LECOCQ, A., JENSEN, A.B., KRYGER, P. y NIEH, J.C., 2016. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. Scientific Reports [en línea], vol. 6, no. 1, ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/srep22042.
- LEE, F.J., MILLER, K.I., MCKINLAY, J.B. y NEWTON, I.L.G., 2018. Differential carbohydrate utilization and organic acid production by honey bee symbionts.

- FEMS Microbiology Ecology, vol. 94, no. 8, ISSN 15746941. DOI 10.1093/FEMSEC/FIY113.
- LEHANE, M.J. y BILLINGSLEY, P.F., 1996. Biology of the Insect Midgut [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands. ISBN 978-94-010-7179-6.
- LEONARD, S.P., POWELL, J.E., PERUTKA, J., GENG, P., HECKMANN, L.C., HORAK, R.D., DAVIES, B.W., ELLINGTON, A.D., BARRICK, J.E. y MORAN, N.A., 2020. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens. Science [en línea], vol. 367, no. 6477, [consulta: 18 diciembre 2021]. ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.aax9039.
- LI, Chenyi, TANG, M., LI, X. y ZHOU, X., 2022. Community Dynamics in Structure and Function of Honey Bee Gut Bacteria in Response to Winter Dietary Shift. En: J.B.H. MARTINY (ed.), mBio [en línea], vol. 13, no. 5, ISSN 2150-7511. DOI 10.1128/mbio.01131-22.
- LI, J., SAUERS, L., ZHUANG, D., REN, H., GUO, J., WANG, L., ZHUANG, M., GUO, Y., ZHANG, Zhengyi, WU, J., YAO, J., YANG, H., HUANG, J., WANG, C., LIN, Q., ZHANG, Zhigang y SADD, B.M., 2023. Divergence and convergence of gut microbiomes of wild insect pollinators. En: M.J. MCFALL-NGAI y W. LUDINGTON (eds.), mBio [en línea], ISSN 2150-7511. DOI 10.1128/mbio.01270-23.
- LI, J.H., EVANS, J.D., LI, W.F., ZHAO, Y.Z., DEGRANDI-HOFFMAN, G., HUANG, S.K., LI, Z.G., HAMILTON, M. y CHEN, Y.P., 2017. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. En: O. RUEPPELL (ed.), PLOS ONE [en línea], vol. 12, no. 11, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0187505.
- LI, M., GONG, J., COITRILL, M., YU, H., DE LANGE, C., BURTON, J. y TOPP, E., 2003. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. Journal of Microbiological Methods [en línea], vol. 54, no. 1, ISSN 01677012. DOI 10.1016/S0167-7012(02)00260-9.
- LI, W., CHEN, Y. y COOK, S.C., 2018. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. International Journal for Parasitology [en línea], vol. 48, no. 6, ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2017.11.004.
- LI, Yiyuan, LEONARD, S.P., POWELL, J.E. y MORAN, N.A., 2022. Species divergence in gut-restricted bacteria of social bees. Proceedings of the National

## Referencias Bibliográficas

- Academy of Sciences [en línea], vol. 119, no. 18, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.2115013119.
- LI, Z., HE, J., YU, T., CHEN, Y., HUANG, W.-F., HUANG, J., ZHAO, Y., NIE, H. y SU, S., 2019. Transcriptional and physiological responses of hypopharyngeal glands in honeybees (*Apis mellifera* L.) infected by *Nosema ceranae*. *Apidologie* [en línea], vol. 50, no. 1, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-018-0617-8.
- LIBERTI, J., KAY, T., QUINN, A., KESNER, L., FRANK, E.T., CABIROL, A., RICHARDSON, T.O., ENGEL, P. y KELLER, L., 2022. The gut microbiota affects the social network of honeybees. *Nature Ecology & Evolution* [en línea], vol. 6, no. 10, ISSN 2397-334X. DOI 10.1038/s41559-022-01840-w.
- LIPA, J.J. y TRIGGIANI, O., 1988. *Critbidia bombi* sp. n. a flagellated parasite of a bumblebee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae). *Acta Protozoologica*, vol. 27, no. 3-4.
- LIU, Q., LEI, J., DARBY, A.C. y KADOWAKI, T., 2020. Trypanosomatid parasite dynamically changes the transcriptome during infection and modifies honey bee physiology. *Communications Biology* [en línea], vol. 3, no. 1, ISSN 2399-3642. DOI 10.1038/s42003-020-0775-x.
- LOPES, A.H., 2010. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal* [en línea], vol. 4, no. 1, ISSN 18744214. DOI 10.2174/1874421401004010030.
- LOPES, A.R., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M., SEGURA, S.K., HENRIQUES, D. y PINTO, M.A., 2022. Colonisation Patterns of *Nosema ceranae* in the Azores Archipelago. *Veterinary Sciences* [en línea], vol. 9, no. 7, ISSN 2306-7381. DOI 10.3390/vetsci9070320.
- LOPES, A.R., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M., SEGURA, S.K., HENRIQUES, D. y PINTO, M.A., 2023. First detection of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Macaronesian archipelago of Madeira. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 62, no. 3, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2023.2172835.
- LUDVIGSEN, J., RANGBERG, A., AVERSHINA, E., SEKELJA, M., KREIBICH, C., AMDAM, G. y RUDI, K., 2015. Shifts in the Midgut/Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. *Microbes and environments* [en línea], vol. 30, no. 3, ISSN 1342-6311. DOI 10.1264/jsme2.ME15019.
- LUKEŠ, J., BUTENKO, A., HASHIMI, H., MASLOV, D.A., VOTÝPKA, J. y YURCHENKO, V., 2018. Trypanosomatids Are Much More than Just

- Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 34, no. 6, ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2018.03.002.
- MACINNIS, C.I., KEDDIE, B.A. y PERNAL, S.F., 2020. *Nosema ceranae* (Microspora: Nosematidae): A Sweet Surprise? Investigating the Viability and Infectivity of *N. ceranae* Spores Maintained in Honey and on Beeswax. En: D. TARPY (ed.), *Journal of Economic Entomology* [en línea], vol. 113, no. 5, ISSN 0022-0493. DOI 10.1093/jee/toaa170.
- MAES, P.W., RODRIGUES, P.A.P., OLIVER, R., MOTT, B.M. y ANDERSON, K.E., 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* [en línea], vol. 25, no. 21, ISSN 0962-1083. DOI 10.1111/mec.13862.
- MARCHE, M.G., SATTA, A., FLORIS, I., PUSCEDDU, M., BUFFA, F. y RUIU, L., 2019. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from *Varroa*-infested colonies. *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 58, no. 3, ISSN 0021-8839. DOI 10.1080/00218839.2019.1589669.
- MARCILLA, A., MARTIN-JAULAR, L., TRELIS, M., DE MENEZES-NETO, A., OSUNA, A., BERNAL, D., FERNANDEZ-BECERRA, C., ALMEIDA, I.C. y DEL PORTILLO, H.A., 2014. Extracellular vesicles in parasitic diseases. *Journal of Extracellular Vesicles* [en línea], vol. 3, no. 1, ISSN 2001-3078. DOI 10.3402/jev.v3.25040.
- MARGULIS, L. y FESTER, R., 1991. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT press.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., BARRIOS, L., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., MEANA, A., MAYACK, C. y HIGES, M., 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* [en línea], vol. 109, no. 3, ISSN 0932-0113. DOI 10.1007/s00436-011-2292-9.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., HIGES, M., SAGASTUME, S., JUARRANZ, Á., DIAS-ALMEIDA, J., BUDGE, G.E., MEANA, A. y BOONHAM, N., 2017. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. En: E. LING (ed.), *PLOS ONE* [en línea], vol. 12, no. 2, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0170183.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., GARCÍA-PALENCIA, P., MARÍN, P., BOTÍAS, C., GARRIDO-BAILÓN, E., BARRIOS, L. y HIGES, M., 2009. Effect of Temperature on the Biotic Potential of Honeybee Microsporidia.

## Referencias Bibliográficas

- Applied and Environmental Microbiology [en línea], vol. 75, no. 8, ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.02908-08.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., PRIETO, L., SALVADOR, A.M., GARRIDO-BAILÓN, E. y HIGES, M., 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Applied and Environmental Microbiology [en línea], vol. 73, no. 20, ISSN 0099-2240. DOI 10.1128/AEM.00270-07.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BARTOLOMÉ, C., CHEJANOVSKY, N., LE CONTE, Y., DALMON, A., DUSSAUBAT, C., GARCÍA-PALENCIA, P., MEANA, A., PINTO, M.A., SOROKER, V. y HIGES, M., 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. Environmental Microbiology [en línea], vol. 20, no. 4, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/1462-2920.14103.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., BAILÓN, E.G., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., PRIETO, L., MEANA, A. y HIGES, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing apis? Environmental Microbiology [en línea], vol. 14, no. 8, ISSN 1462-2912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.
- MARTIN, S.J., 1994. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Experimental and Applied Acarology [en línea], vol. 18, no. 2, ISSN 0168-8162. DOI 10.1007/BF00055033.
- MARTIN, S.J., HIGHFIELD, A.C., BRETTELL, L., VILLALOBOS, E.M., BUDGE, G.E., POWELL, M., NIKAIDO, S. y SCHROEDER, D.C., 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. Science [en línea], vol. 336, no. 6086, ISSN 0036-8075. DOI 10.1126/science.1220941.
- MARTÍNEZ, J., LEAL, G. y CONGET, P., 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. Parasitology Research, vol. 111, no. 2, ISSN 14321955. DOI 10.1007/s00436-012-2875-0.
- MARTINSON, V.G., DANFORTH, B.N., MINCKLEY, R.L., RUEPPELL, O., TINGEK, S. y MORAN, N.A., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Molecular Ecology [en línea], vol. 20, no. 3, ISSN 09621083. DOI 10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x.
- MARTINSON, V.G., MOY, J. y MORAN, N.A., 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Applied and Environmental Microbiology, vol. 78, no. 8, ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.07810-11.

- MASLOV, D.A., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V. y LUKEŠ, J., 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, vol. 29, no. 1, ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2012.11.001.
- MAYACK, C. y NAUG, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 100, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2008.12.001.
- MAZZEI, M., CARROZZA, M.L., LUISI, E., FORZAN, M., GIUSTI, M., SAGONA, S., TOLARI, F. y FELICIONI, A., 2014. Infectivity of DWV associated to flower pollen: Experimental evidence of a horizontal transmission route. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 11, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0113448.
- MCDONALD, C., TAYLOR, D. y LINACRE, A., 2024. PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes*, vol. 15, no. 4, ISSN 20734425. DOI 10.3390/genes15040438.
- MCFADDEN, A.M.J., MACKAY, J., BOROWICK, O. y GOODWIN, R.M., 2016. Investigation of bee mortality in a beekeeper operation in the Coromandel district. *Surveillance (Wellington)* [en línea], vol. 43, no. 1.
- MCFREDERICK, Q.S., CANNONE, J.J., GUTELL, R.R., KELLNER, K., PLOWES, R.M. y MUELLER, U.G., 2013. Specificity between lactobacilli and hymenopteran hosts is the exception rather than the rule. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 6, ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.03681-12.
- MCFREDERICK, Q.S., THOMAS, J.M., NEFF, J.L., VUONG, H.Q., RUSSELL, K.A., HALE, A.R. y MUELLER, U.G., 2017. Flowers and Wild Megachilid Bees Share Microbes. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 73, no. 1, ISSN 00953628. DOI 10.1007/s00248-016-0838-1.
- MCFREDERICK, Q.S., WCISLO, W.T., HOUT, M.C. y MUELLER, U.G., 2014. Host species and developmental stage, but not host social structure, affects bacterial community structure in socially polymorphic bees. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 88, no. 2, ISSN 15746941. DOI 10.1111/1574-6941.12302.
- MCFREDERICK, Q.S., WCISLO, W.T., TAYLOR, D.R., ISHAK, H.D., DOWD, S.E. y MUELLER, U.G., 2012. Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Molecular Ecology*, vol. 21, no. 7, ISSN 09621083. DOI 10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x.
- MCORIST, A.L., JACKSON, M. y BIRD, A.R., 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of*

## Referencias Bibliográficas

- Microbiological Methods, vol. 50, no. 2, ISSN 01677012. DOI 10.1016/S0167-7012(02)00018-0.
- MEANA, A., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. Journal of Apicultural Research [en línea], vol. 49, no. 2, ISSN 0021-8839. DOI 10.3896/IBRA.1.49.2.12.
- MEEUS, I., DE GRAAF, D.C., JANS, K. y SMAGGHE, G., 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. Journal of Applied Microbiology [en línea], vol. 109, no. 1, ISSN 1364-5072. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04635.x.
- MICHALCZYK, M., SOKÓŁ, R. y KOZIATEK, S., 2016. Evaluation of the effectiveness of selected treatments of *Nosema* spp. infection by the hemocytometric method and duplex PCR. Acta Veterinaria, vol. 66, no. 1, ISSN 18207448. DOI 10.1515/acve-2016-0009.
- MOCKLER, B.K., KWONG, W.K., MORAN, N.A. y KOCH, H., 2018. Microbiome structure influences infection by the parasite *Critidia bombi* in bumble bees. Applied and Environmental Microbiology, vol. 84, no. 7, ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.02335-17.
- MOHR, K.I. y TEBBE, C.C., 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. Environmental Microbiology, vol. 8, no. 2, ISSN 14622912. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x.
- MONDET, F., DE MIRANDA, J.R., KRETZSCHMAR, A., LE CONTE, Y. y MERCER, A.R., 2014. On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. PLoS Pathogens, vol. 10, no. 8, ISSN 15537374. DOI 10.1371/journal.ppat.1004323.
- MORAN, N.A., HANSEN, A.K., POWELL, J.E. y SABREE, Z.L., 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE, vol. 7, no. 4, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0036393.
- MOREIRA, D., SANTARÉM, N., LOUREIRO, I., TAVARES, J., SILVA, A.M., AMORIM, A.M., OUAISSI, A., CORDEIRO-DA-SILVA, A. y SILVESTRE, R., 2012. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. En: S. KAMHAWI (ed.), PLoS Neglected Tropical Diseases [en línea], vol. 6, no. 1, ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0001469.

- MORIMOTO, T., KOJIMA, Y., YOSHIYAMA, M., KIMURA, K., YANG, B., PENG, G. y KADOWAKI, T., 2013. Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 5, no. 1, ISSN 17582229. DOI 10.1111/j.1758-2229.2012.00385.x.
- MORSE, R. y HOOPER, T., 1985. *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. S.I.: Dutton Adult. ISBN 9780525242437.
- MOTTA, E.V.S. y MORAN, N.A., 2024. The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, vol. 22, no. 3, ISSN 17401534. DOI 10.1038/s41579-023-00990-3.
- MRÁZ, P., HÝBL, M., KOPECKÝ, M., BOHATÁ, A., HOŠTIČKOVÁ, I., ŠIPOŠ, J., VOČADLOVÁ, K. y ČURN, V., 2021. Screening of Honey Bee Pathogens in the Czech Republic and Their Prevalence in Various Habitats. *Insects [en línea]*, vol. 12, no. 12, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects12121051.
- MÜLLER, U., MCMAHON, D.P. y ROLFF, J., 2019. Exposure of the wild bee *Osmia bicornis* to the honey bee pathogen *Nosema ceranae*. *Agricultural and Forest Entomology*, vol. 21, no. 4, ISSN 14619563. DOI 10.1111/afe.12338.
- MUÑOZ, I., GARRIDO-BAILÓN, E., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., HIGES, M. y DE LA RÚA, P., 2008. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal of Apicultural Research*, vol. 47, no. 4, ISSN 00218839. DOI 10.3896/IBRA.1.47.4.13.
- MURAKAMI, M., 2013. Evaluation of DNA Plasmid Storage Conditions. *The Open Biotechnology Journal*, vol. 7, no. 1, ISSN 1874-0707. DOI 10.2174/1874070701307010010.
- NADAL-JIMENEZ, P., SIOZIOS, S., FROST, C.L., COURT, R., CHROSTEK, E., DREW, G.C., EVANS, J.D., HAWTHORNE, D.J., BURRITT, J.B. y HURST, G.D.D., 2022. *Arsenophonus apicola* sp. nov., isolated from the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 72, no. 8, ISSN 14665034. DOI 10.1099/ijsem.0.005469.
- NANETTI, A., UGOLINI, L., CILIA, G., PAGNOTTA, E., MALAGUTI, L., CARDAIO, I., MATTEO, R. y LAZZERI, L., 2021. Seed meals from *Brassica nigra* and *Eruca sativa* control artificial *Nosema ceranae* infections in *Apis mellifera*. *Microorganisms*, vol. 9, no. 5, ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms9050949.
- NÄPFLIN, K. y SCHMID-HEMPEL, P., 2018. High gut microbiota diversity provides lower resistance against infection by an intestinal parasite in bumblebees. *American Naturalist*, vol. 192, no. 2, ISSN 00030147. DOI 10.1086/698013.

## Referencias Bibliográficas

- NAREE, S., ELLIS, J.D., BENBOW, M.E. y SUWANNAPONG, G., 2022. Experimental *Nosema ceranae* infection is associated with microbiome changes in the midguts of four species of *Apis* (honey bees). *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 61, no. 3, ISSN 20786913. DOI 10.1080/00218839.2021.1987086.
- NAUG, D., 2014. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biology Letters*, vol. 10, no. 11, ISSN 1744957X. DOI 10.1098/rsbl.2014.0731.
- NEOV, B., GEORGIEVA, A., SHUMKOVA, R., RADOSLAVOV, G. y HRISTOV, P., 2019. Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity*, vol. 11, no. 12, ISSN 14242818. DOI 10.3390/d11120237.
- NEUVONEN, M.M., TAMARIT, D., NÄSLUND, K., LIEBIG, J., FELDHAAR, H., MORAN, N.A., GUY, L. y ANDERSSON, S.G.E., 2016. The genome of Rhizobiales bacteria in predatory ants reveals urease gene functions but no genes for nitrogen fixation. *Scientific Reports* [en línea], vol. 6, no. November, ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep39197.
- NEVELING, D.P., ENDO, A. y DICKS, L.M.T., 2012. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Current Microbiology*, vol. 65, no. 5, ISSN 03438651. DOI 10.1007/s00284-012-0186-4.
- NOZAL, M.J., BERNAL, J.L., MARTÍN, M.T., BERNAL, J., ÁLVARO, A., MARTÍN, R. y HIGES, M., 2008. Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 1190, no. 1-2, ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2008.03.019.
- OCEPEK, M.P., TOPLAK, I., ZAJC, U. y BEVK, D., 2021. The pathogens spillover and incidence correlation in bumblebees and honeybees in Slovenia. *Pathogens*, vol. 10, no. 7, ISSN 20760817. DOI 10.3390/pathogens10070884.
- OLDROYD, B.P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 14, no. 8, ISSN 01695347. DOI 10.1016/S0169-5347(99)01613-4.
- OLOFSSON, T.C., ALSTERFJORD, M., NILSON, B., BUTLER, È. y VÁSQUEZ, A., 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladü* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey bee stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal*

- of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 64, ISSN 14665026. DOI 10.1099/ijs.0.059600-0.
- ONCHURU, T.O., JAVIER MARTINEZ, A., INGHAM, C.S. y KALTENPOTH, M., 2018. Transmission of mutualistic bacteria in social and gregarious insects. 1 agosto 2018. Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cois.2018.05.002
- OUDEMANS, D.A.C., 1904. On a new genus and species of Parasitic. Notes from the Leyden Museum, vol. 24, no. 4, pp. 216-222.
- PAKWAN, C., KALTENPOTH, M., WEISS, B., CHANTAWANNAKUL, P., JUN, G. y DISAYATHANOOWAT, T., 2018. Bacterial communities associated with the ectoparasitic mites *Varroa destructor* and *Tropilaelaps mercedesae* of the honey bee (*Apis mellifera*). FEMS Microbiology Ecology, vol. 94, no. 1, ISSN 15746941. DOI 10.1093/femsec/fix160.
- PALMER-YOUNG, E.C., RAFFEL, T.R. y MCFREDERICK, Q.S., 2019. pH-mediated inhibition of a bumble bee parasite by an intestinal symbiont. Parasitology [en línea], vol. 146, no. 3, ISSN 0031-1820. DOI 10.1017/S0031182018001555.
- PANEK, J., PARIS, L., RORIZ, D., MONE, A., DUBUFFET, A., DELBAC, F., DIOGON, M. y EL ALAOU, H., 2018. Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 159, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2018.09.007.
- PANJAD, P., YONGSAWAS, R., SINPOO, C., PAKWAN, C., SUBTA, P., KRONGDANG, S., IN-ON, A., CHOMDEJ, S., CHANTAWANNAKUL, P. y DISAYATHANOOWAT, T., 2021. Impact of *Nosema* disease and american foulbrood on gut bacterial communities of honeybees *Apis mellifera*. Insects, vol. 12, no. 6, ISSN 20754450. DOI 10.3390/insects12060525.
- PARIS, L., PEGHAIRE, E., MONÉ, A., DIOGON, M., DEBROAS, D., DELBAC, F. y EL ALAOU, H., 2020. Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 172, no. February, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2020.107348.
- PARIS, L., ROUSSEL, M., PEREIRA, B., DELBAC, F. y DIOGON, M., 2017. Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. Microbial Biotechnology, vol. 10, no. 6, ISSN 17517915. DOI 10.1111/1751-7915.12772.

- PARMENTIER, A., BILLIET, A., SMAGGHE, G., VANDAMME, P., DEFORCE, D., VAN NIEUWERBURGH, F. y MEEUS, I., 2018. A prokaryotic–eukaryotic relation in the fat body of *Bombus terrestris*. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 10, no. 6, ISSN 17582229. DOI 10.1111/1758-2229.12673.
- PARSONS, M., 2004. Glycosomes: Parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular Microbiology*, vol. 53, no. 3, ISSN 0950382X. DOI 10.1111/j.1365-2958.2004.04203.x.
- PAXTON, R.J., KLEE, J., KORPELA, S. y FRIES, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, vol. 38, no. 6, ISSN 00448435. DOI 10.1051/apido:2007037.
- PENG, Y., BAER-IMHOOF, B., HARVEY MILLAR, A. y BAER, B., 2015. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports* [en línea], vol. 5, ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep10565.
- PENG, Y.S., NASR, M.E. y MARSTON, J.M., 1986. Release of Alfalfa, *Medicago sativa*, Pollen Cytoplasm in the Gut of the Honey Bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 79, no. 3, ISSN 00138746. DOI 10.1093/aesa/79.5.804.
- POWELL, J.E., EIRI, D., MORAN, N.A. y RANGEL, J., 2018. Modulation of the honey bee queen microbiota: Effects of early social contact. *PLoS ONE*, vol. 13, no. 7, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0200527.
- POWELL, J.E., LEONARD, S.P., KWONG, W.K., ENGEL, P. y MORAN, N.A., 2016. Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 48, ISSN 10916490. DOI 10.1073/pnas.1610856113.
- POWELL, J.E., MARTINSON, V.G., URBAN-MEAD, K. y MORAN, N.A., 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 80, no. 23, ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.01861-14.
- PRŶS-JONES, O.E., WILLIAMS, P.H. y CAROLAN, J.C., 2018. Bumblebees of the Azores (Apidae: *Bombus*). *Journal of Natural History* [en línea], vol. 52, no. 5-6, ISSN 0022-2933. DOI 10.1080/00222933.2018.1432776.
- PTASZYŃSKA, A.A., BORSUK, G., ZDYBICKA-BARABAS, A., CYTRYŃSKA, M. y MALEK, W., 2016. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitology Research*, vol. 115, no. 1, ISSN 14321955. DOI 10.1007/s00436-015-4761-z.

- QUINTANA, S., PLISCHUK, S., BRASESCO, C., REVAINERA, P., GENCHI GARCÍA, M.L., BRAVI, M.E., REYNALDI, F., EGUARAS, M. y MAGGI, M., 2021. *Lotmaria passim* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in honey bees from Argentina. *Parasitology International* [en línea], vol. 81, no. May 2020, ISSN 18730329. DOI 10.1016/j.parint.2020.102244.
- RAMSEY, S.D., OCHOA, R., BAUCHAN, G., GULBRONSON, C., MOWERY, J.D., COHEN, A., LIM, D., JOKLIK, J., CICERO, J.M., ELLIS, J.D., HAWTHORNE, D. y 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 United States of America*, vol. 116, no. 5, ISSN 10916490. DOI 10.1073/pnas.1818371116.
- RANWEZ, V., HARISPE, S., DELSUC, F. y DOUZERY, E.J.P., 2011. MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences Accounting for Frameshifts and Stop Codons. En: W.J. MURPHY (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 6, no. 9, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0022594.
- RAVOET, J., MAHARRAMOV, J., MEEUS, I., DE SMET, L., WENSELEERS, T., SMAGGHE, G. y DE GRAAF, D.C., 2013. Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. En: Y. LI (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 8, no. 8, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0072443.
- RAVOET, J., SCHWARZ, R.S., DESCAMPS, T., YAÑEZ, O., TOZKAR, C.O., MARTIN-HERNANDEZ, R., BARTOLOMÉ, C., DE SMET, L., HIGES, M., WENSELEERS, T., SCHMID-HEMPEL, R., NEUMANN, P., KADOWAKI, T., EVANS, J.D. y DE GRAAF, D.C., 2015. Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 130, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2015.06.007.
- RAYMANN, K., MOTTA, E.V.S., GIRARD, C., RIDDINGTON, I.M., DINSER, J.A. y MORAN, N.A., 2018. Imidacloprid decreases honey bee survival rates but does not affect the gut microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 84, no. 13, ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.00545-18.
- RAYMANN, K., SHAFFER, Z. y MORAN, N.A., 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, vol. 15, no. 3, ISSN 15457885. DOI 10.1371/journal.pbio.2001861.
- RETSCHNIG, G., WILLIAMS, G.R., MEHMANN, M.M., YAÑEZ, O., DE MIRANDA, J.R. y NEUMANN, P., 2014. Sex-specific differences in pathogen

## Referencias Bibliográficas

- susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). PLoS ONE, vol. 9, no. 1, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0085261.
- RICIGLIANO, V.A., FITZ, W., COPELAND, D.C., MOTT, B.M., MAES, P., FLOYD, A.S., DOCKSTADER, A. y ANDERSON, K.E., 2017. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. Archives of Insect Biochemistry and Physiology [en línea], vol. 96, no. 2, ISSN 0739-4462. DOI 10.1002/arch.21406.
- RINDERER, T.E., DE GUZMAN, L.I., LANCASTER, V.A., DELATTE, G.T. y STELZER, J.A., 1999. *Varroa* in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan® on drone honey bees. American Bee Journal, vol. 139, no. 2, ISSN 00027626.
- RÍOS SÁNCHEZ, E., CALLEROS, E., GONZÁLEZ ZAMORA, A., RUBIO, J., MARTÍNEZ, O.C., MARTÍNEZ, A., HERNÁNDEZ, S. y PÉREZ MORALES, R., 2016. Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population. Acta Universitaria, vol. 26, no. 4, ISSN 01886266. DOI 10.15174/au.2016.1078.
- ROBERTS, K.E., EVISON, S.E.F., BAER, B. y HUGHES, W.O.H., 2015. The cost of promiscuity: Sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. Scientific Reports [en línea], vol. 5, no. April, ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep10982.
- RÖDER, B., FRÜHWIRTH, K., VOGL, C., WAGNER, M. y ROSSMANITH, P., 2010. Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods. Journal of Clinical Microbiology, vol. 48, no. 11, ISSN 00951137. DOI 10.1128/JCM.01230-10.
- RODRÍGUEZ-GARCÍA, C., HIGES, M., DE LA RÚA, P. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2014. Comparative analysis of different methods for gDNA extraction and detection of *Nosema ceranae*, *Nosema apis* and *Nosema bombi*. Eurbee 6th European Conference of Apidology, pp. 211.
- ROSENKRANZ, P., AUMEIER, P. y ZIEGELMANN, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 103, no. SUPPL. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2009.07.016.
- ROSS, K.S., HAITES, N.E. y KELLY, K.F., 1990. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: Effects on DNA yield and integrity. Journal of Medical Genetics, vol. 27, no. 9, ISSN 00222593. DOI 10.1136/jmg.27.9.569.

- ROTHMAN, J.A., CARROLL, M.J., MEIKLE, W.G., ANDERSON, K.E. y MCFREDERICK, Q.S., 2018. Longitudinal Effects of Supplemental Forage on the Honey Bee (*Apis mellifera*) Microbiota and Inter- and Intra-Colony Variability. *Microbial Ecology* [en línea], vol. 76, no. 3, ISSN 0095-3628. DOI 10.1007/s00248-018-1151-y.
- ROUBIK, D.W., 1995. *Pollination of cultivated plants in the tropics*. S.l.: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 9251036594.
- ROUZÉ, R., MONÉ, A., DELBAC, F., BELZUNCES, L. y BLOT, N., 2019. The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and Environments*, vol. 34, no. 3, ISSN 13474405. DOI 10.1264/jsme2.ME18169.
- RUBANOV, A., RUSSELL, K.A., ROTHMAN, J.A., NIEH, J.C. y MCFREDERICK, Q.S., 2019. Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-019-40347-6.
- RUNCKEL, C., FLENNIKEN, M.L., ENGEL, J.C., RUBY, J.G., GANEM, D., ANDINO, R. y DERISI, J.L., 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Cribridia*. En: R.F.A. MORITZ (ed.), *PLoS ONE* [en línea], vol. 6, no. 6, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0020656.
- SABATÉ, D.C., CRUZ, M.S., BENÍTEZ-AHRENDTS, M.R. y AUDISIO, M.C., 2012. Beneficial Effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a Honey-Associated Strain, on Honeybee Colony Performance. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, vol. 4, no. 1, ISSN 18671306. DOI 10.1007/s12602-011-9089-0.
- SACCÀ, M.L. y LODESANI, M., 2020. Isolation of bacterial microbiota associated to honey bees and evaluation of potential biocontrol agents of *Varroa destructor*. *Beneficial Microbes*, vol. 11, no. 7, ISSN 18762891. DOI 10.3920/BM2019.0164.
- SAELAO, P., BORBA, R.S., RICIGLIANO, V., SPIVAK, M. y SIMONE-FINSTROM, M., 2020. Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis. *Biology Letters*, vol. 16, no. 5, ISSN 1744957X. DOI 10.1098/rsbl.2020.0003.
- SALTYKOVA, E.S., GAIFULLINA, L.R., KASKINOVA, M.D., GATAULLIN, A.R., MATNIYAZOV, R.T., POSKRYAKOV, A. V. y NIKOLENKO, A.G., 2018. Effect of Chitosan on Development of *Nosema apis* Microsporidia in Honey Bees. *Microbiology (Russian Federation)*, vol. 87, no. 5, ISSN 00262617. DOI 10.1134/S0026261718050144.

## Referencias Bibliográficas

- SANTOS, C.G. y SERRÃO, J.E., 2006. Histology of the Ileum in Bees (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of the Morphological Sciences*, vol. 23, no. 3, pp. 405-413.
- SCARDOVI, V. y TROVATELLI, L.D., 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie [en línea]*, vol. 123, no. 1, ISSN 0044-4057.
- SCHAUB, G.A., 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, vol. 10, no. 12, ISSN 01694758. DOI 10.1016/0169-4758(94)90155-4.
- SCHAUDIEN, D., BAUMGÄRTNER, W. y HERDEN, C., 2007. High preservation of DNA standards diluted in 50% glycerol. *Diagnostic Molecular Pathology*, vol. 16, no. 3, ISSN 10529551. DOI 10.1097/PDM.0b013e31803c558a.
- SCHMID-HEMPEL, P., 2001. On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: Addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, vol. 88, no. 4, ISSN 00281042. DOI 10.1007/s001140100222.
- SCHMID-HEMPEL, R. y TOGNAZZO, M., 2010. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 57, no. 4, ISSN 10665234. DOI 10.1111/j.1550-7408.2010.00480.x.
- SCHMIDT, K. y ENGEL, P., 2016. Probiotic Treatment with a Gut Symbiont Leads to Parasite Susceptibility in Honey Bees. *Trends in Parasitology [en línea]*, vol. 32, no. 12, ISSN 14715007. DOI 10.1016/j.pt.2016.09.005.
- SCHMITTNER, S.M. y MCGHEE, R.B., 1970. Host Specificity of Various Species of *Crithidia* Leger. *The Journal of Parasitology*, vol. 56, no. 4, ISSN 00223395. DOI 10.2307/3277713.
- SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. y JOHNE, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 5, ISSN 13652672. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- SCHWARZ, R.S., BAUCHAN, G.R., MURPHY, C.A., RAVOET, J., DE GRAAF, D.C. y EVANS, J.D., 2015. Characterization of two species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 62, no. 5, ISSN 15507408. DOI 10.1111/jeu.12209.

- SCHWARZ, R.S. y EVANS, J.D., 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology* [en línea], vol. 40, no. 3-4, ISSN 0145305X. DOI 10.1016/j.dci.2013.03.010.
- SCHWARZ, R.S., HUANG, Q. y EVANS, J.D., 2015. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. *Current Opinion in Insect Science* [en línea], vol. 10, ISSN 22145753. DOI 10.1016/j.cois.2015.04.006.
- SCHWARZ, R.S., MORAN, N.A. y EVANS, J.D., 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 33, ISSN 10916490. DOI 10.1073/pnas.1606631113.
- SEELEY, T.D., 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 11, no. 4, ISSN 03405443. DOI 10.1007/BF00299306.
- SEGERS, F.H., KEŠNEROVÁ, L., KOSOY, M. y ENGEL, P., 2017. Genomic changes associated with the evolutionary transition of an insect gut symbiont into a blood-borne pathogen. *ISME Journal*, vol. 11, no. 5, ISSN 17517370. DOI 10.1038/ismej.2016.201.
- SHAO, L., DEVENPORT, M. y JACOBS-LORENA, M., 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 47, no. 2, ISSN 07394462. DOI 10.1002/arch.1042.abs.
- SHYKOFF, J.A. y SCHMID-HEMPEL, P., 1991. Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 28, no. 5, ISSN 03405443. DOI 10.1007/BF00164387.
- SIDSTEDT, M., RÅDSTRÖM, P. y HEDMAN, J., 2020. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, no. 9, ISSN 16182650. DOI 10.1007/s00216-020-02490-2.
- SILHAVY, T.J., KAHNE, D. y WALKER, S., 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [en línea], vol. 2, no. 5, ISSN 1943-0264. DOI 10.1101/cshperspect.a000414.
- SIMON, J.-C., MARCHESI, J.R., MOUGEL, C. y SELOSSE, M.-A., 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* [en línea], vol. 7, no. 1, ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/s40168-019-0619-4.

## Referencias Bibliográficas

- SMART, M.D. y SHEPPARD, W.S., 2012. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 109, no. 1, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2011.09.009.
- SMITH, E.A., ANDERSON, K.E., CORBY-HARRIS, V., MCFREDERICK, Q.S., PARISH, A.J., RICE, D.W. y NEWTON, I.L.G., 2021. Reclassification of seven honey bee symbiont strains as *Bombella apis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol. 71, no. 9, ISSN 14665034. DOI 10.1099/ijsem.0.004950.
- SMITH, E.A. y NEWTON, I.L.G., 2020. Genomic signatures of honey bee association in an acetic acid symbiont. Genome Biology and Evolution, vol. 12, no. 10, ISSN 17596653. DOI 10.1093/GBE/EVAA183.
- SMITH, M.L., 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? PLoS ONE, vol. 7, no. 8, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0043319.
- SNODGRASS, R.E., 1984. The Anatomy of the Honey bee. Cornell Paperbacks ISBN 0-8014-9302-1.
- STEELE, M.I. y MORAN, N.A., 2021. Evolution of Interbacterial Antagonism in Bee Gut Microbiota Reflects Host and Symbiont Diversification. mSystems, vol. 6, no. 3, ISSN 2379-5077. DOI 10.1128/msystems.00063-21.
- STEELE, M.I., MOTTA, E.V.S., GATTU, T., MARTINEZ, D. y MORAN, N.A., 2021. The Gut Microbiota Protects Bees from Invasion by a Bacterial Pathogen. En: S.C. LEE (ed.), Microbiology Spectrum [en línea], vol. 9, no. 2, ISSN 2165-0497. DOI 10.1128/Spectrum.00394-21.
- STEFANINI, I., 2018. Yeast-insect associations: It takes guts. Yeast [en línea], vol. 35, no. 4, ISSN 10970061. DOI 10.1002/yea.3309.
- STEPHENS, J.L., SOO, H.L., PAUL, K.S. y ENGLUND, P.T., 2007. Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*. Journal of Biological Chemistry, vol. 282, no. 7, ISSN 00219258. DOI 10.1074/jbc.M609037200.
- STEVANOVIC, J., SCHWARZ, R.S., VEJNOVIC, B., EVANS, J.D., IRWIN, R.E., GLAVINIC, U. y STANIMIROVIC, Z., 2016. Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, vol. 139, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2016.07.001.

- STEVANOVIC, J., STANIMIROVIC, Z., GENERSCH, E., KOVACEVIC, S.R., LJUBENKOVIC, J., RADAKOVIC, M. y ALEKSIC, N., 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, vol. 42, no. 1, ISSN 00448435. DOI 10.1051/apido/2010034.
- STROBL, V., YAÑEZ, O., STRAUB, L., ALBRECHT, M. y NEUMANN, P., 2019. Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *International Journal for Parasitology [en línea]*, vol. 49, no. 8, ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2019.03.006.
- SU, Q., TANG, M., HU, J., TANG, J., ZHANG, X., LI, X., NIU, Q., ZHOU, Xuguo, LUO, S. y ZHOU, Xin, 2022. Significant compositional and functional variation reveals the patterns of gut microbiota evolution among the widespread Asian honeybee populations. *Frontiers in Microbiology*, vol. 13, no. September, ISSN 1664302X. DOI 10.3389/fmicb.2022.934459.
- SUBOTIC, S., BODDICKER, A.M., NGUYEN, V.M., RIVERS, J., BRILES, C.E. y MOSIER, A.C., 2019. Honey bee microbiome associated with different hive and sample types over a honey production season. *PLoS ONE [en línea]*, vol. 14, no. 11, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0223834.
- SZALANSKI, A.L., TRAMMEL, C.E., TRIPODI, A.D., CLEARY, D., RUSERT, L. y DOWNEY, D., 2016. Molecular Diagnostics of the Honey Bee Parasites *Lotmaria passim* and *Crithidia* spp. (Trypanosomatidae) Using Multiplex PCR. *Florida Entomologist*, vol. 99, no. 4, ISSN 00154040. DOI 10.1653/024.099.0438.
- TAKASHIMA, S., OHARI, Y. y ITAGAKI, T., 2021. Prevalence of *Nosema* species infections in *Apis cerana japonica* and *Apis mellifera* honeybees in the Tohoku region of Japan. *Parasitology International [en línea]*, vol. 83, no. April 2020, ISSN 18730329. DOI 10.1016/j.parint.2021.102361.
- TAN, S.Q., ZHANG, K.Q., CHEN, H.X., GE, Y., JI, R. y SHI, W.P., 2015. The mechanism for microsporidian parasite suppression of the hindgut bacteria of the migratory locust *Locusta migratoria manilensis*. *Scientific Reports*, vol. 5, no. October, ISSN 20452322. DOI 10.1038/srep17365.
- TARIC, E., GLAVINIC, U., VEJNOVIC, B., STANOJKOVIC, A., ALEKSIC, N., DIMITRIJEVIC, V. y STANIMIROVIC, Z., 2020. Oxidative Stress, Endoparasite Prevalence and Social Immunity in Bee Colonies Kept Traditionally vs. Those Kept for Commercial Purposes. *Insects [en línea]*, vol. 11, no. 5, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects11050266.

## Referencias Bibliográficas

- TARPY, D.R., MATTILA, H.R. y NEWTON, I.L.G., 2015. Development of the honey bee gut microbiome throughout the queen-rearing process. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 9, ISSN 10985336. DOI 10.1128/AEM.00307-15.
- TAUBER, J.P., NGUYEN, V., LOPEZ, D. y EVANS, J.D., 2019. Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and *Nosema* disease. *Insects*, vol. 10, no. 9, ISSN 20754450. DOI 10.3390/insects10090296.
- TEIXEIRA, A. das D., MARQUES-ARAÚJO, S., ZANUNCIO, J.C. y SERRÃO, J.E., 2019. Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 58, no. 3, ISSN 20786913. DOI 10.1080/00218839.2019.1584961.
- TERRA, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* [en línea], vol. 47, no. 2, ISSN 07394462. DOI 10.1002/arch.1036.
- TERRA, W.R., BARROSO, I.G., DIAS, R.O. y FERREIRA, C., 2019. Molecular Physiology of Insect Midgut. *Advances in Insect Physiology* [en línea]. S.I.: Elsevier, pp. 117-163.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C. y BAKER, J.E., 1996. *Biology of the Insect Midgut* [en línea]. Dordrecht: Springer Netherlands. ISBN 978-94-010-7179-6.
- TEXIER, C., VIDAU, C., VIGUÈS, B., EL ALAOU, H. y DELBAC, F., 2010. Microsporidia: A model for minimal parasite-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 13, no. 4, ISSN 13695274. DOI 10.1016/j.mib.2010.05.005.
- TIAN, B., FADHIL, N.H., POWELL, J.E., KWONG, W.K. y MORAN, N.A., 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio*, vol. 3, no. 6, ISSN 21612129. DOI 10.1128/mBio.00377-12.
- TOKAREV, Y.S., ZINATULLINA, Z.Y., IGNATIEVA, A.N., ZHIGILEVA, O.N., MALYSH, J.M. y SOKOLOVA, Y.Y., 2018. Detection of two Microsporidia pathogens of the European honey bee *Apis mellifera* (Insecta: Apidae) in Western Siberia. *Acta Parasitologica*, vol. 63, no. 4, ISSN 12302821. DOI 10.1515/ap-2018-0086.
- TOLA, Y.H., WAWERU, J.W., HURST, G.D.D., SLIPPERS, B. y PAREDES, J.C., 2020. Characterization of the kenyan honey bee (*Apis mellifera*) gut microbiota: A first look at tropical and sub-saharan african bee associated microbiomes.

- Microorganisms, vol. 8, no. 11, ISSN 20762607. DOI 10.3390/microorganisms8111721.
- TOTH, A.L., KANTAROVICH, S., MEISEL, A.F. y ROBINSON, G.E., 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology*, vol. 208, no. 24, ISSN 00220949. DOI 10.1242/jeb.01956.
- TOTH, A.L. y ROBINSON, G.E., 2005. Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, vol. 69, no. 2, ISSN 00033472. DOI 10.1016/j.anbehav.2004.03.017.
- TRAVER, B.E. y FELL, R.D., 2011. *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 107, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2011.05.016.
- TRAYNOR, K.S., MONDET, F., DE MIRANDA, J.R., TECHER, M., KOWALLIK, V., ODDIE, M.A.Y., CHANTAWANNAKUL, P. y MCAFEE, A., 2020. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology* [en línea], vol. 36, no. 7, ISSN 14715007. DOI 10.1016/j.pt.2020.04.004.
- URBIETA-MAGRO, A., HIGES, M., MEANA, A., BARRIOS, L. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2019b. Age and Method of Inoculation Influence the Infection of Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) by *Nosema ceranae*. *Insects* [en línea], vol. 10, no. 12, ISSN 2075-4450. DOI 10.3390/insects10120417.
- URBIETA-MAGRO, A., HIGES, M., MEANA, A., GÓMEZ-MORACHO, T., RODRÍGUEZ-GARCÍA, C., BARRIOS, L. y MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., 2019a. The levels of natural *Nosema* spp. infection in *Apis mellifera iberiensis* brood stages. *International Journal for Parasitology*, vol. 49, no. 8, ISSN 18790135. DOI 10.1016/j.ijpara.2019.04.002.
- VALERA, F., GÓMEZ-MORACHO, T., YUAN, H.W., MUÑOZ, I., DE LA RÚA, P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., CHEN, Y.L. y HIGES, M., 2017. Any role for the dissemination of *Nosema* spores by the blue-tailed bee-eater *Merops philippinus*? *Journal of Apicultural Research* [en línea], vol. 56, no. 3, ISSN 20786913. DOI 10.1080/00218839.2017.1306375.
- VALERA, F., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. y HIGES, M., 2011. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environmental Microbiology Reports*, vol. 3, no. 1, ISSN 17582229. DOI 10.1111/j.1758-2229.2010.00186.x.

- VALIZADEH, P., GUZMAN-NOVOA, E. y GOODWIN, P.H., 2020. Effect of immune inducers on *Nosema ceranae* multiplication and their impact on honey bee (*Apis mellifera* L.) survivorship and behaviors. *Insects*, vol. 11, no. 9, ISSN 20754450. DOI 10.3390/insects11090572.
- VANENGLSDORP, D. y MEIXNER, M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of invertebrate pathology*, vol. 103, pp. 80-95. DOI 10.1016/j.jip.2009.06.011
- VAN DEN HEEVER, J.P., THOMPSON, T.S., CURTIS, J.M., IBRAHIM, A. y PERNAL, S.F., 2014. Fumagillin: An overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 13, ISSN 15205118. DOI 10.1021/jf4055374.
- VAN DEN HEEVER, J.P., THOMPSON, T.S., OTTO, S.J.G., CURTIS, J.M., IBRAHIM, A. y PERNAL, S.F., 2016. Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie [en línea]*, vol. 47, no. 5, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-015-0409-3.
- VÁSQUEZ, A., FORSGREN, E., FRIES, I., PAXTON, R.J., FLABERG, E., SZEKELY, L. y OLOFSSON, T.C., 2012. Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0033188.
- VAYSSIER-TAUSSAT, M., ALBINA, E., CITTI, C., COSSON, J.F., JACQUES, M.A., LEBRUN, M.H., LE LOIR, Y., OGLIASTRO, M., PETIT, M.A., ROUMAGNAC, P. y CANDRESSE, T., 2014. Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 5, no. MAR, ISSN 22352988. DOI 10.3389/fcimb.2014.00029.
- VEJNOVIC, B., STEVANOVIC, J., SCHWARZ, R.S., ALEKSIC, N., MIRILOVIC, M., JOVANOVIC, N.M. y STANIMIROVIC, Z., 2018. Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology [en línea]*, vol. 151, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2017.11.003.
- VIDAU, C., PANEK, J., TEXIER, C., BIRON, D.G., BELZUNCES, L.P., LE GALL, M., BROUSSARD, C., DELBAC, F. y EL ALAOUI, H., 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology [en línea]*, vol. 121, ISSN 10960805. DOI 10.1016/j.jip.2014.07.002. D

- VILLAGOMEZ, G.N., NÜRNBERGER, F., REQUIER, F., SCHIELE, S. y STEFFAN-DEWENTER, I., 2021. Effects of temperature and photoperiod on the seasonal timing of Western honey bee colonies and an early spring flowering plant. *Ecology and Evolution*, vol. 11, no. 12, ISSN 20457758. DOI 10.1002/ece3.7616.
- VILLANUEVA, A. V., PODZORSKI, R.P. y REYES, M.P., 1998. Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, no. 7, ISSN 00951137. DOI 10.1128/jcm.36.7.2117-2119.1998.
- VOJVODIC, S., REHAN, S.M. y ANDERSON, K.E., 2013. Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. En: G. SMAGGHE (ed.), PLoS ONE [en línea], vol. 8, no. 8, ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0072106.
- VOTÝPKA, J., D'AVILA-LEVY, C.M., GRELLIER, P., MASLOV, D.A., LUKEŠ, J. y YURCHENKO, V., 2015. New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, vol. 31, no. 10, ISSN 14715007. DOI 10.1016/j.pt.2015.06.015.
- VOULGARI-KOKOTA, A., MCFREDERICK, Q.S., STEFFAN-DEWENTER, I. y KELLER, A., 2019. Drivers, Diversity, and Functions of the Solitary-Bee Microbiota. *Trends in Microbiology* [en línea], vol. 27, no. 12, ISSN 18784380. DOI 10.1016/j.tim.2019.07.011.
- WAGNER, A. y DEHIO, C., 2019. Role of distinct type-IV-secretion systems and secreted effector sets in host adaptation by pathogenic *Bartonella* species. *Cellular Microbiology* [en línea], vol. 21, no. 3, ISSN 1462-5814. DOI 10.1111/cmi.13004.
- WANG, D.-I. y MOELLER, F.E., 1971. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* [en línea], vol. 17, no. 3, ISSN 00222011. DOI 10.1016/0022-2011(71)90002-4.
- WANG, H., LIU, C., LIU, Z., WANG, Y., MA, L. y XU, B., 2020. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. *BMC Microbiology* [en línea], vol. 20, no. 1, ISSN 1471-2180. DOI 10.1186/s12866-020-01726-6.
- WANG, K., LI, J., ZHAO, L., MU, X., WANG, C., WANG, M., XUE, X., QI, S. y WU, L., 2021. Gut microbiota protects honey bees (*Apis mellifera* L.) against polystyrene microplastics exposure risks. *Journal of Hazardous Materials* [en

## Referencias Bibliográficas

- línea], vol. 402, no. September 2020, ISSN 18733336. DOI 10.1016/j.jhazmat.2020.123828.
- WANG, L., LI, F., WANG, B. y XIANG, J., 2012. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology [en línea], vol. 33, no. 6, ISSN 10959947. DOI 10.1016/j.fsi.2012.09.014.
- WANG, Q., DAI, P., GUZMAN-NOVOA, E., WU, Y., HOU, C. y DIAO, Q., 2019. *Nosema ceranae*, the most common microsporidium infecting *Apis mellifera* in the main beekeeping regions of China since at least 2005. Journal of Apicultural Research [en línea], vol. 58, no. 4, ISSN 20786913. DOI 10.1080/00218839.2019.1632148.
- WATERS, T.L., 2018. The distribution and population dynamics of the honey bee pathogens *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in New Zealand. Tesis Doctoral: Victoria University.
- WEISS, L.M., 2003. Microsporidia 2003: IWOP-8. Journal of Eukaryotic Microbiology, vol. 50, no. SUPPL., ISSN 10665234. DOI 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00631.x.
- WIDMER, A., SCHMID-HEMPEL, P., ESTOUP, A. y SCHOLL, A., 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. Heredity [en línea], vol. 81, no. 5, ISSN 0018067X. DOI 10.1038/sj.hdy.6884070.
- WILFERT, L., LONG, G., LEGGETT, H.C., SCHMID-HEMPEL, P., BUTLIN, R., MARTIN, S.J.M. y BOOTS, M., 2016. Honeybee disease: Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. Science, vol. 351, no. 6273, ISSN 10959203. DOI 10.1126/science.aac9976.
- WILLIAMS, I.H., 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. Agricultural Science Reviews, vol. 6.
- WILLIAMS, M.K.F., TRIPODI, A.D. y SZALANSKI, A.L., 2019. Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. Journal of Apicultural Research [en línea], vol. 58, no. 4, ISSN 20786913. DOI 10.1080/00218839.2019.1568956.
- WILSON, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, no. 10, ISSN 00992240. DOI 10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997.

- WINSTON, M.L., 1991. The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press. ISBN 9780674744202.
- WITTNET, M. y WEISS, L.M., 1999. The Microsporidia and Microsporidiosis [en línea]. Washington, DC, USA: ASM Press. ISBN 9781683672616.
- WOLF, S., MCMAHON, D.P., LIM, K.S., PULL, C.D., CLARK, S.J., PAXTON, R.J. y OSBORNE, J.L., 2014. So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. PLoS ONE, vol. 9, no. 8, ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0103989.
- WRIGHT, G.A., NICOLSON, S.W. y SHAFIR, S., 2018. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. Annual Review of Entomology, vol. 63, no. October, ISSN 00664170. DOI 10.1146/annurev-ento-020117-043423.
- WU, Y., ZHENG, Y., CHEN, Yanan, WANG, S., CHEN, Yanping, HU, F. y 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, vol. 13, no. 4, ISSN 17517915. DOI 10.1111/1751-7915.13579.
- XIAO, J., 2017. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? Critical Reviews in Food Science and Nutrition [en línea], vol. 57, no. 9, ISSN 15497852. DOI 10.1080/10408398.2015.1032400.
- XU, G., PALMER-YOUNG, E., SKYRM, K., DALY, T., SYLVIA, M., AVERILL, A. y RICH, S., 2018. Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. Parasitology Research, vol. 117, no. 2, ISSN 14321955. DOI 10.1007/s00436-017-5733-2.
- YAMAMOTO, S., NAKAMURA, S., NAKAYAMA, K., KUSAKISAKO, K., WATANABE, K., IKADAI, H. y TANABE, T., 2023. Molecular detection of *Lotmaria passim* in honeybees in Japan. Parasitology International [en línea], vol. 93, no. September 2022, ISSN 13835769. DOI 10.1016/j.parint.2022.102711.
- YAÑEZ, O., GAUTHIER, L., CHANTAWANNAKUL, P. y NEUMANN, P., 2016. Endosymbiotic bacteria in honey bees: *Arsenophonus* spp. are not transmitted transovarially. FEMS Microbiology Letters, vol. 363, no. 14, ISSN 15746968. DOI 10.1093/femsle/fnw147.
- YANG, B., PENG, G., LI, T. y KADOWAKI, T., 2013. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. Ecology and Evolution, vol. 3, no. 2, ISSN 20457758. DOI 10.1002/ece3.464.

## Referencias Bibliográficas

- YOSHIYAMA, M. y KIMURA, K., 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. Journal of Invertebrate Pathology [en línea], vol. 106, no. 2, ISSN 00222011. DOI 10.1016/j.jip.2010.10.010.
- YUN, J.H., JUNG, M.J., KIM, P.S. y BAE, J.W., 2018. Social status shapes the bacterial and fungal gut communities of the honey bee. Scientific Reports [en línea], vol. 8, no. 1, ISSN 20452322. DOI 10.1038/s41598-018-19860-7.
- ZANDER, E., 1909. Tierische parasiten als krankheitserreger bei der biene. Münchener Bienenzeitung, vol. 31,
- ZCHORI-FEIN, E. y BOURTZIS, K., 2011. Manipulative Tenants [en línea]. S.l.: CRC Press. ISBN 9780429103575.
- ZHANG, Y., LU, X., HUANG, S., ZHANG, L., SU, S. y HUANG, W.F., 2019. *Nosema ceranae* infection enhances *Bifidobacterium* spp. abundances in the honey bee hindgut. Apidologie, ISSN 12979678. DOI 10.1007/s13592-019-00644-5.
- ZHANG, Y., SU, M., WANG, L., HUANG, S., SU, S. y HUANG, W.-F., 2021. *Vairimorpha* (*Nosema*) *ceranae* Infection Alters Honey Bee Microbiota Composition and Sustains the Survival of Adult Honey Bees. Biology [en línea], vol. 10, no. 9, ISSN 2079-7737. DOI 10.3390/biology10090905.
- ZHENG, H., NISHIDA, A., KWONG, W.K., KOCH, H., ENGEL, P., STEELE, M.I. y MORAN, N.A., 2016. Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. mBio, vol. 7, no. 6, ISSN 21507511. DOI 10.1128/mBio.01326-16.
- ZHENG, H., PERREAU, J., POWELL, J.E., HAN, B., ZHANG, Z., KWONG, W.K., TRINGE, S.G. y MORAN, N.A., 2019. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. Proceedings of the National Academy of Sciences [en línea], vol. 116, no. 51, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1916224116.
- ZHENG, H., POWELL, J.E., STEELE, M.I., DIETRICH, C. y MORAN, N.A., 2017. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences [en línea], vol. 114, no. 18, ISSN 0027-8424. DOI 10.1073/pnas.1701819114.
- ZHENG, H., STEELE, M.I., LEONARD, S.P., MOTTA, E.V.S. y MORAN, N.A., 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. Lab Animal [en línea], vol. 47, no. 11, ISSN 0093-7355. DOI 10.1038/s41684-018-0173-x.
- ZHENG, J., WITTOUCK, S., SALVETTI, E., FRANZ, C.M.A.P., HARRIS, H.M.B., MATTARELLI, P., O'TOOLE, P.W., POT, B., VANDAMME, P., WALTER,

- J., WATANABE, K., WUYTS, S., FELIS, G.E., GÄNZLE, M.G. y 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* [en línea], vol. 70, no. 4, ISSN 1466-5026. DOI 10.1099/ijsem.0.004107.
- ZIEGELMANN, B., LINDENMAYER, A., STEIDLE, J. y ROSENKRANZ, P., 2013. The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. *Apidologie* [en línea], vol. 44, no. 3, ISSN 0044-8435. DOI 10.1007/s13592-012-0182-5.

## Referencias Bibliográficas

# ANEXO I

Publicaciones científicas







# Frequent Parasitism of *Apis mellifera* by Trypanosomatids in Geographically Isolated Areas with Restricted Beekeeping Movements

Daniel Aguado-López<sup>1</sup> · Carolina Bartolomé<sup>2</sup> · Ana Rita Lopes<sup>3,4</sup> · Dora Henriques<sup>3,4</sup> · Sara Kafafi Segura<sup>5</sup> · Xulio Maside<sup>2</sup> · M. Alice Pinto<sup>3,4</sup> · Mariano Higes<sup>1</sup> · Raquel Martín-Hernández<sup>1,6</sup>

Received: 10 April 2023 / Accepted: 7 July 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

## Abstract

Trypanosomatids form a group of high prevalence protozoa that parasitise honey bees, with *Lotmaria passim* as the predominant species worldwide. However, the knowledge about the ecology of trypanosomatids in isolated areas is limited. The Portuguese archipelagos of Madeira and Azores provide an interesting setting to investigate these parasites because of their geographic isolation, and because they harbour honey bee populations devoid of two major enemies: *Varroa destructor* and *Nosema ceranae*. Hence, a total of 661 honey bee colonies from Madeira and the Azores were analysed using different molecular techniques, through which we found a high prevalence of trypanosomatids despite the isolation of these islands. *L. passim* was the predominant species and, in most colonies, was the only one found, even on islands free of *V. destructor* and/or *N. ceranae* with severe restrictions on colony movements to prevent the spread of them. However, islands with *V. destructor* had a significantly higher prevalence of *L. passim* and, conversely, islands with *N. ceranae* did not show any significant correlation with the trypanosomatid. *Crithidia bombi* was detected in Madeira and on three islands of the Azores, almost always coincident with *L. passim*. By contrast, *Crithidia mellificae* was not detected in any sample. A high-throughput sequencing analysis distinguished two main haplotypes of *L. passim*, which accounted for 98% of the total sequence reads. This work suggests that *L. passim* and *C. bombi* are parasites that have been associated with honey bees predated the spread of *V. destructor* and *N. ceranae*.

**Keywords** Honey bee · Trypanosomatids · *Lotmaria passim* · PCR · Sequencing · *Varroa destructor*

## Introduction

Trypanosomatidae are a group of parasitic protozoa that can infect a wide range of organisms, from plants to insects and vertebrates [1, 2]. In recent years, particular interest has focused on their infection of honey bees because of their possible involvement in increased colony mortality. The first trypanosomatid described in honey bees was *Crithidia mellificae* [3] and, subsequently, *Crithidia bombi* was identified in bumble bees [4]. These parasites were not given special attention until the beginning of the twenty-first century [5–11] and until then, the trypanosomatids found in honey bees were thought to be limited to *C. mellificae* in honey bees and to *C. bombi* in bumble bees. However, the advances

in molecular techniques led to the discovery of a new species: *Lotmaria passim* [8], whose existence had previously been suggested from genetic data [12]. The re-evaluation of all the molecular data obtained in previous works showed that many sequences were incorrectly assigned to *C. mellificae* and, in fact, it became clear that *L. passim* was the predominant species worldwide [13–15]. Thus, *L. passim* seems to have been present in honey bee colonies long before its description, although there is no scientific evidence as to whether it is a novel honey bee parasite that recently spread worldwide, similar to *Varroa destructor* and *Nosema ceranae*, or whether it is an old parasite.

Due to the geographic isolation of the host populations, islands offer an ideal stage to assess these hypotheses and study the ecology and dynamics of invasive pathogen colonisation. Yet, there are very few trypanosomatid studies on islands, and these have been limited to the Pacific, including Japan [10, 16], New Zealand [15, 17, 18] and Hawaii [19]. Therefore, surveys from islands at other geographical

✉ Raquel Martín-Hernández  
rmbhernandez@jccm.es

Extended author information available on the last page of the article

latitudes would shed additional light as to whether these microorganisms are recent or ancient honey bee parasites. To this regard, the Portuguese archipelagos of the Azores and Madeira are located in the Atlantic Ocean, 1400 km and 900 km from the European mainland, Lisbon, respectively. The first introduction of honey bees on these islands dates back to the sixteenth century. These were taken by the Portuguese settlers, or by later inhabitants, when the islands were used as stopovers on the way to the Americas [20–22]. According to the latest report of the Portuguese Bee Health Programme [23], there are currently more than 10,000 honey bee colonies in Madeira and around 8000 in the Azores. The severe restrictions on the importation of honey bees imposed since 2007 make the Azores archipelago epidemiologically unique, with six of the nine islands remaining free of *V. destructor*. Remarkably, in addition to being one of the few places in the world free of the mite [24], two of the Azorean islands (Flores and Santa Maria) have also escaped the worldwide spread of the microsporidium *N. ceranae* [25]. Therefore, the Azorean archipelago provides an incomparable setting for studying parasite ecology, as it is home to all kinds of parasite combinations. In light of this, we conducted a survey of trypanosomatids in the Azores as well as on Madeira, which was earlier colonised by *V. destructor*. The ultimate goal was to establish the prevailing trypanosomatid species and also to ascertain whether the queen marketing and colony movement that have been implicated in the spread of *V. destructor* have also influenced the distribution of trypanosomatids across the islands. To that end, we employed molecular methods on a cross-sectional honey bee sample that allow detection of an array of trypanosomatids, including *C. mellificae* and *L. passim*, which typically parasitize honey bees, and also species such as *C. bombi*, *Crithidia expoeki* and *Crithidia acanthocephali*, more rarely associated with honey bees [26].

## Methods

### Survey and Sample Collection

This cross-sectional study is part of a larger survey conducted between 2014 and 2015 to describe the prevalence of pathogens in the Azores and Madeira archipelagos. The survey was carried out following the design described elsewhere [25, 27] and in accordance with the number of colonies on each island registered in 2013, with an expected pathogen prevalence of 15%, a precision rate of 10% and a confidence level of 95%. About 150 adult honey bee workers were collected from 159 georeferenced apiaries of the Azores in the Summer of 2014 and 2015, and from 23 georeferenced apiaries of Madeira in the Spring of 2014. Samples were collected from three random colonies, and in a

few cases from two or four colonies per apiary, resulting in a total of 483 samples for the Azores and 89 for Madeira. In addition, the islands of Faial, São Jorge, Santa Maria and Terceira were re-sampled in the Summer of 2020 (89 colonies in 34 apiaries). In this later sampling, each sample comprised 20–30 workers. Samples from the Azores were shipped alive to the Centro de Investigação de Montanha (CIMO, Portugal) and then sent on dry ice to the Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA, Spain). Samples from Madeira were collected in ethanol and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until shipping to CIAPA. All samples were kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further analysis.

### DNA Extraction

For each colony sampled in the Azores and Madeira in 2014–2015, a subsample of 120 workers was selected and processed as described previously [25]. In brief, the honey bees were macerated in 50% AL buffer (Qiagen®) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain supernatant and sediment that were processed separately. The sediment was resuspended in 3 mL of milli-Q water and the DNA was extracted as described previously [25]. Only for the 2014–2015 Azorean samples, 400  $\mu\text{L}$  of each supernatant was transferred to a 96-well plate (Deepwell, Eppendorf), treated with 15  $\mu\text{L}$  of protease (Qiagen®) and incubated at  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Afterwards, the DNA was extracted as indicated before [25].

The samples collected in 2020 in the Azores were processed similarly, but in this case the 20–30 honey bees were macerated in 5 mL of autoclaved milli-Q water in a Stomacher 80. In these samples, no phase separation was made so that 400  $\mu\text{L}$  of each macerate was directly transferred to a 96-well Collection Microtube plate (Qiagen®) with glass beads (2 mm diameter, Sigma) and shaken (3 min, 30 Hz) in a TissueLyser (Qiagen®). Then, 150  $\mu\text{L}$  of each sample was dispensed into a plate with 150  $\mu\text{L}$  of 50% AL buffer and 15  $\mu\text{L}$  of protease. After incubation, the DNA was extracted as above mentioned [25].

Extracted negative controls were included in all the processing and DNA extraction steps (one every 20 samples) and processed in parallel. All samples were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### Sediment Versus Supernatant

Samples from the Azores from 2014 to 2015 were first processed for the detection of other pathogens in a different study [25] and, due to their value, were reused in this study. Since sediment and supernatant were available and it was not known which phase was the best for detecting these parasites after honey bee maceration, DNA obtained from the two phases was analysed separately to determine

which was the best substrate for the detection of Trypanosomatidae. For this purpose, DNA was extracted from the sediment and supernatant of each sample, as above, and analysed in parallel by PCR, in order to compare the number of positive samples obtained in each phase.

### Trypanosomatidae Detection

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the Trypanosomatidae in all the samples (sediment from Madeira samples, supernatant and sediment from the 2014–2015 Azorean samples, and macerate from the 2020 Azorean samples) with the Tryp RPB1 primers described elsewhere [26] and shown in Table 1. These primers target the *DNA-dependent RNA polymerase I (rpb1)* gene and they amplify a fragment of 283 bp from all Trypanosomatidae species that have been detected in honey bees to date.

PCRs were performed in a 25- $\mu$ L volume containing 13.25  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ L of 5X Phusion™ HF buffer, 0.5  $\mu$ L of a 10 mM dNTP mix, 2.5  $\mu$ L of each primer (5  $\mu$ M), 0.25  $\mu$ L of Phusion™ DNA Polymerase (Thermo Fisher) and 1  $\mu$ L of the DNA template. The PCR temperature profile was set according to the manufacturer's instructions, and consisted of an initial denaturation at 98 °C for 30 s, followed by 45 cycles at 98 °C for 10 s, 62.2 °C for 30 s and 72 °C for 10 s, and a final extension of 8 min at 72 °C. PCRs were carried out in a Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf) and the resulting amplicons were analysed in a QIAxcel Advanced System (Qiagen®), storing the remaining PCR product at –20 °C for further processing. Extraction and PCR negative controls and a positive control were included in all the analyses and run in parallel. In the case of 2014–2015 Azorean samples, as both sediment and supernatant were analysed, a sample was considered positive if there was amplification in at least one of the phases.

### High-Throughput Sequencing

A subset of 91 positive samples that were positive for Trypanosomatidae were sequenced on the Illumina MiSeq platform together with negative controls. The PCR product of the positive samples was quantified in a NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (ThermoScientific™) to determine the DNA concentration and sent frozen to Universidade de Santiago de Compostela (CIMUS, Spain) for library preparation and sequencing.

Amplicons from each sample were used as input to prepare the library using the KAPA HyperPrep kit (Roche Sequencing Solutions Inc.), following the manufacturer's protocol directly from the end-repair and A-tailing step. Library pools were normalised to a concentration of 4 nM and loaded at a concentration of 12 pM on an Illumina MiSeq instrument for 1 × 300 bp single-end sequencing (Flowcell Nano V2, 2 × 150 bp).

The reads generated in the sequencing run were de-multiplexed according to the barcodes assigned to each sample, and then processed with *fastp* [29] for adaptor removal and quality filtering. The reads were then organised into individual files that contained the number and sequence haplotypes detected for each amplicon in a sample, as well as the number of reads in each direction (forward and reverse). Sequences with less than 5 reads were discarded. Subsequently, the files were converted to *fasta* format for sequence alignment with MACSE v2.05 (Multiple Alignment of Coding SEquences), a program that aligns protein-coding gene datasets without disrupting the underlying codon structure [29]. The reference sequences of the *rpb1* were obtained from GenBank for *L. passim* (MT558272.1 and LT976801.1), *C. mellificae* (MT558227.1 and MT558204.1), *C. bombi* (MT558162.1 and MT558134.1), *C. acanthocephali* (MW28878781.1) and a new Trypanosomatidae species (Trypanosomatidae sp. MN038411.1), recently described [26]. Sequences were visualised with *BioEdü* [30] and those

**Table 1** Primers and probes used for the molecular analysis of the honey bee samples

References	Target	Primers	Sequence 5'–3'
[26]	Trypanosomatidae	Tryp RPB1-F1 Tryp RPB1-R1	GTGGCTGGAYCTGTGGGAGC GCCRTTGATGAACCTTCGCCAC
[28]	<i>C. mellificae</i>	qCmell_Cytb_F qCmell_Cytb_R qCmell_Cytb_P	TTTTCGCATGCACTATGATGTCT AACCTATTACAGGCACAGTTGCTAAA 6FAM-ATTGAGGATTAACAGTGTTTAGT-BHQ1
	<i>L. passim</i>	qL_pass_TOPI1_F qL_pass_TOPI1_R	GGCCATGGAAATACTCGAGTCT ACCTTGCCCTTCCTTCTTGAGATT
	<i>C. bombi</i>	qCbom_RPB1_F qCbom_RPB1_R qCbom_RPB1_P	6FAM-CCTCGACACGC+T+TA+GT-BHQ1 TGGTGGGTGCGATTACGAA TCATTGAAGATGACGTGGATAAGC 6FAM-CGTTGTGCGGCGCCG-BHQ1

containing indels or stop codons were removed from the final dataset.

### Species-Specific Detection

All Trypanosomatidae-positive samples that were not sequenced by high-throughput sequencing (HTS) were analysed by real-time qPCR (qPCR) for the species-specific detection of *L. passim*, *C. mellificae* and *C. bombi* using the primers described elsewhere [28] and shown in Table 1. The qPCR was performed on DNA obtained from Madeira samples, from both sediment and supernatant of the 2014–2015 Azorean samples, and from samples without phase separation from the 2020 Azorean samples. Negative and positive controls were also tested in parallel in all PCRs. As for Trypanosomatidae detection in the 2014–2015 Azorean samples, a sample was considered positive if there was amplification from either of the two phases. Amplicons from samples that gave a negative result by the specific qPCR but a positive result by the standard PCR amplification with the Tryp RPB1 primers were purified with QIAquick (Qiagen®) and Sanger sequenced in both directions (Genomic Unit, Universidad Complutense, Spain) on a 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences were checked manually with *BioEdit* [30] and compared with the sequences downloaded from GenBank using BLAST.

The geographical distribution of the colonies was compiled and plotted for each island using the *ArcGIS desktop* software [31].

### Statistical Analysis

Chi-square tests were performed to compare the sensitivity of Trypanosomatidae detection in the sediment and supernatant phases. Generalised linear models with a binomial family and a logit link function were used to determine whether the presence of *V. destructor* or *N. ceranae* influenced the prevalence of *L. passim* at the island scale, including island as covariable. In the latter case, only data from samples from the Azores collected in 2014–2015 were used, as this sampling was conducted and analysed homogeneously.

## Results

### Comparison Between Sediment and Supernatant

To determine the best phase for Trypanosomatidae detection, sediment and supernatant analysis was performed on 477 Azorean samples collected in 2014–2015 (Table 2; six samples out of 483 had insufficient supernatant for this assay). The supernatant produced the highest number of positive samples (55.34%) as compared to the sediment (50.73%),

**Table 2** Number (and percentage) of Trypanosomatidae-positive (+) and Trypanosomatidae-negative (–) samples detected on the supernatant and sediment phases obtained from the honey bee macerates

	Supernatant (+)	Supernatant (–)	Total
Sediment (+)	161 (33.75%)	81 (16.98%)	<b>242 (50.73%)</b>
Sediment (–)	103 (21.59%)	132 (27.67%)	<b>235 (49.27%)</b>
Total	264 (55.34%)	213 (44.65%)	<b>477 (100%)</b>

**Table 3** Number of colonies and apiaries sampled in each island, number of colonies positive for Trypanosomatidae and corresponding prevalence (%). <sup>1</sup>Varroa-free islands; <sup>2</sup>Nosema-free islands

	Apiaries (N)	Colonies (N)	Positive colonies (N)	Prevalence (%)
2014–2015				
Madeira	23	89	59	66.3
Azores				
Santa Maria <sup>1,2</sup>	19	57	48	84.2
São Miguel <sup>1</sup>	30	105	84	80.0
São Jorge <sup>1</sup>	17	37	19	51.4
Faial	20	60	43	71.7
Pico	25	75	69	92.0
Graciosa <sup>1</sup>	7	22	5	22.7
Terceira <sup>1</sup>	26	80	43	53.8
Flores <sup>2</sup>	15	47	37	78.7
Total	159	483	348	72.0
2020				
Santa Maria <sup>1,2</sup>	12	28	12	42.9
São Jorge <sup>1</sup>	10	30	5	16.7
Faial	2	8	2	25.0
Terceira <sup>1</sup>	10	23	9	39.1
Total	34	89	28	31.5
Total	216	661	435	

although no statistically significant differences were found between both phases ( $\chi^2=2.04$ ,  $gI=1$ ;  $p=0.15$ ). No trypanosomatid DNA was detected in any negative controls.

### Prevalence of Trypanosomatidae

The prevalence of Trypanosomatidae is shown in Table 3. As the Madeira, Azores 2014–2015 and Azores 2020 samples were processed differently, no comparisons were made between those 3 groups. In Madeira, the prevalence was 66.3%, whereas in the Azores was 72% in 2014–2015, with the highest number of infected colonies detected on Pico (92%) and the lowest on Graciosa (22.7%). In the later sampling period (2020), 31.5% of the colonies were positive,

with the largest percentage detected on Santa Maria (42.9%) and the lowest on São Jorge (16.7%).

## Species Identification

### High-Throughput Sequencing

A total of 91 samples identified as positive to Trypanosomatidae by the PCR assay were sequenced on the Illumina MiSeq platform. The sequencing run produced 1,385,021 raw reads, which yielded 1,208,665 Trypanosomatidae sequences after filtering, representing an average of 13,282 sequences per sample. Strikingly, identification of all sequence reads revealed that *L. passim* was the only species present in the dataset. Two main haplotypes were found in all samples and on all islands and accounted for about 98% of the sequences found (Table 4) and these matched the reference sequences MT558272.1 and LT976801.1 (hereafter referred to as Lp1 and Lp2, respectively) downloaded from GenBank. These two haplotypes were found distributed within each island without any defined geographical pattern and they differed by a single nucleotide in the amplicon at position 29, with Lp1 having a T and Lp2, a C (Supp. Figure 1). On average, 72.9% of the reads from all the islands corresponded to the Lp2 haplotype, whereas 25.3% of the sequences corresponded to the Lp1 haplotype. This difference was most notable in samples collected in Madeira and in samples collected in 2014–2015 from all islands of central group, where more than the 70% of sequences

corresponded to the Lp2 haplotype (Table 4; Fig. 1). The remaining 2% of sequences were found at a very low frequency and appeared to be variants from the majority haplotypes with additional single nucleotide changes and did not match any sequence available in GenBank. The sequences of the haplotypes found (both Lp1 and Lp2 and those at low frequencies) were deposited in GenBank (accession numbers OR117383-OR117469).

### Real-time qPCR Species Confirmation

The rest of the Tryp-RPB1 positive samples ( $n=344$ ) were analysed by qPCR to detect the presence of *L. passim*, *C. mellificae* and/or *C. bombi*. At least one of these species was identified in 341 samples, whereas three samples (from Madeira, Santa Maria and São Miguel) were negative (Table 5). No amplification was observed in any of the negative controls.

The qPCR analysis confirmed that *L. passim* was the predominant but not the only species on Madeira and in the Azores, as *C. bombi* was also found on some islands (Table 5). In the first sampling period, infection by *L. passim* was identified alone in 64.2% of the positive samples on Madeira, while *C. bombi* was found in 34% of the positive samples, always together with *L. passim* (Table 5). On São Jorge, Pico, Graciosa, Santa Maria and Terceira, *L. passim* was the only species detected, whereas *C. bombi* was found as a mono-infection in one colony on Flores (3.7%). Yet, on São Miguel and Faial, this species was always associated with *L. passim* infection. In the samples collected in 2020, *L. passim* was the only Trypanosomatidae detected (Table 5). Finally, *C. mellificae* was not found in any of the samples analysed throughout the study.

Sanger sequencing of the Tryp RPB1 primer amplicons of the three negative samples after qPCR showed 100% homology with the MT558162.1 sequence of *C. bombi* in the Madeira sample, in the Santa Maria sample the sequence was identical to Lp2, while in the São Miguel sample, two peaks for C/T at position 29 of the amplicon, corresponding to the Lp1 and Lp2 haplotypes, were easily distinguishable.

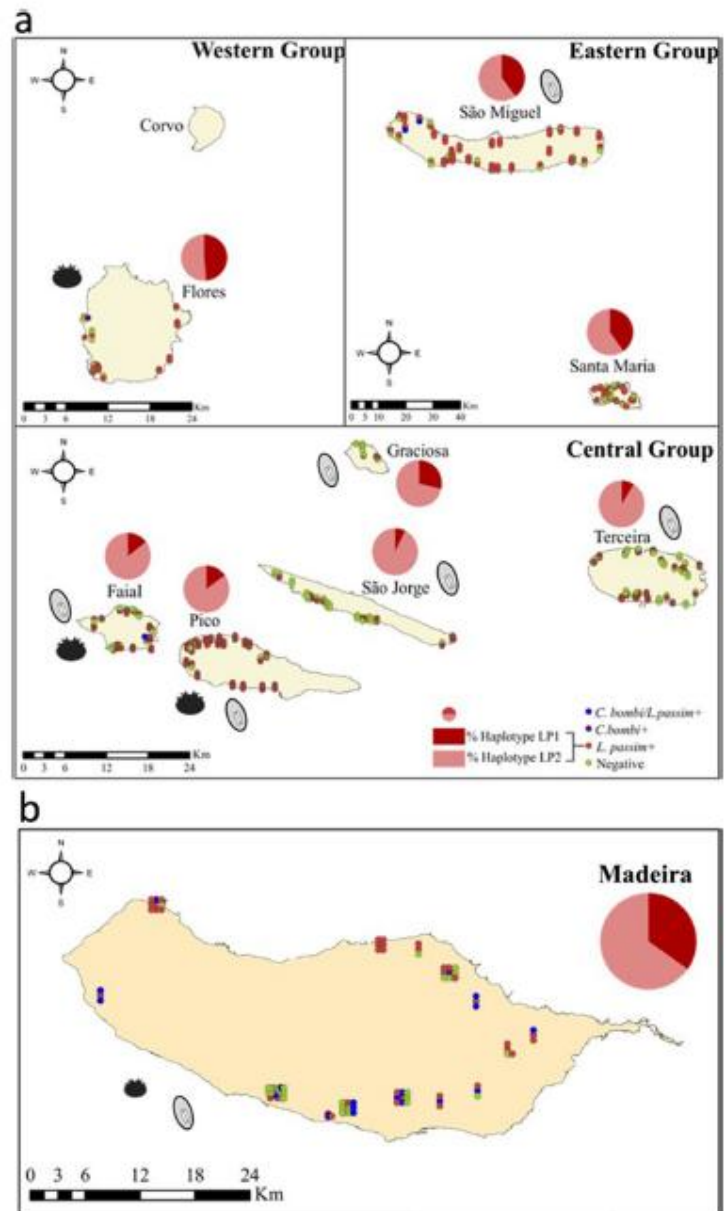
### Total Occurrence of Trypanosomatidae Species on Madeira and the Azores

The occurrence of each Trypanosomatidae species calculated by compiling all the results obtained using the different techniques (HTS, qPCR and Sanger sequencing) is shown in Table 6 and Fig. 1. On Madeira, the proportion of colonies in which Trypanosomatidae were detected was 66.3%, with *L. passim* being the only species detected in 44.9%, *C. bombi* in 1.1% and both species concomitantly in 20.2% of the samples analysed. In the 2014–2015 samples from the Azores, 348 colonies were positive for Trypanosomatidae

**Table 4** Average number of total and valid reads (sequences with < 5 reads were removed), generated by the MiSeq platform for 91 Trypanosomatidae-positive samples, and proportion of the two main *L. passim* haplotypes (Lp1 and Lp2) detected on each island. <sup>1</sup>Varroa-free islands; <sup>2</sup>Nosema-free islands

	N	Total reads	Valid reads	% Lp1	% Lp2
2014–2015					
Madeira	6	12,678	11,509	34.2	64.1
Azores					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	10	15,809	14,547	39.2	59.0
São Miguel <sup>1</sup>	10	12,940	11,812	39.5	58.8
São Jorge <sup>1</sup>	7	12,982	11,700	6.5	91.0
Faial	10	12,886	11,883	14.5	83.6
Pico	10	12,642	11,652	14.9	83.2
Graciosa <sup>1</sup>	4	12,827	11,725	27.9	70.9
Terceira <sup>1</sup>	9	12,204	11,152	9.0	89.3
Flores <sup>2</sup>	10	13,256	12,137	47.6	50.8
2020					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	5	14,321	13,146	37.7	60.5
São Jorge <sup>1</sup>	5	13,459	12,490	19.8	78.4
Terceira <sup>1</sup>	5	13,261	12,116	12.8	84.7
Total	91	13,282	12,168	25.3	72.9

**Fig. 1** Geographical distribution of *C. bombi* and *L. passim* (and its haplotypes) in the Azores archipelago (a) and Madeira (b). ● indicates the islands where *V. destructor* is present. ○ indicates the islands where *N. ceranae* is present. The red colour in sector charts indicates the percentage of sequences that matched with L.p1 haplotype while the pink colour indicates the percentage of sequences that matched with L.p2 haplotype. ● *C. bombi*+*L. passim*; ● *C. bombi*; ● *L. passim*; ● Negative sample



(72.0%). *L. passim* was found on all the islands, and it was the only species detected in 71.2% of samples. *C. bombi* was rarely found in the Azores, being the only species detected in one colony on Flores (0.2%) and occurred concurrently with *L. passim* on São Miguel and Faial (0.6%). In the 2020 samples, all the colonies that were positive for Trypanosomatidae (31.5%) were also positive for *L. passim*, and this was the only species found in this sampling period (Table 6).

Finally, as previously mentioned, *C. mellificae* was not detected in any of the samples tested.

As *L. passim* was the main species found, the influence of *V. destructor* and *N. ceranae* was only studied for this trypanosomatid. Thus, the prevalence of *L. passim* was significantly higher on the Azores islands (2014–2015 samples) with *V. destructor* (Table 7, regression coefficient=0.77;  $z$  value=3.41;  $p < 0.01$ ) than on those without the mite. In

**Table 5** Percentage of each Trypanosomatidae species detected in positive samples. *ND*, not detected. <sup>1</sup>*Varroa*-free islands; <sup>2</sup>*Nosema*-free islands

	<i>N</i>	Only <i>L. passim</i>	Only <i>C. mellificae</i>	Only <i>C. bombi</i>	Co-occurrence <i>L. passim/C. bombi</i>
2014–2015					
Madeira	53	64.2	ND	ND	34
Azores					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	38	97.4	ND	ND	ND
São Miguel <sup>1</sup>	74	95.9	ND	ND	2.7
São Jorge <sup>1</sup>	12	100	ND	ND	ND
Faial	33	97	ND	ND	3
Pico	59	100	ND	ND	ND
Graciosa <sup>1</sup>	1	100	ND	ND	ND
Terceira <sup>1</sup>	34	100	ND	ND	ND
Flores <sup>2</sup>	27	96.3	ND	3.7	ND
Total	278	97.8	ND	0.4	1.1
2020					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	7	100	ND	ND	ND
Faial	2	100	ND	ND	ND
Terceira <sup>1</sup>	4	100	ND	ND	ND
Total	13	100	ND	ND	ND

**Table 6** Prevalence of Trypanosomatidae (%) detected either alone or simultaneously on each island grouping the data from all the tools used (conventional PCR, HTS, qPCR and Sanger sequencing). Number of samples analysed as shown in Table 3. *ND*, not detected. <sup>1</sup>*Varroa*-free islands; <sup>2</sup>*Nosema*-free islands

	Trypanosomatidae	Only <i>L. passim</i>	Only <i>C. mellificae</i>	Only <i>C. bombi</i>	Co-occurrence <i>L. passim/C. bombi</i>
2014–2015					
Madeira	<b>663</b>	<b>449</b>	<b>ND</b>	<b>1.1</b>	<b>20.2</b>
Azores					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	84.2	84.2	ND	ND	ND
São Miguel <sup>1</sup>	80.0	78.1	ND	ND	1.9
São Jorge <sup>1</sup>	51.4	51.4	ND	ND	ND
Faial	71.7	70.0	ND	ND	1.7
Pico	92.0	92.0	ND	ND	ND
Graciosa <sup>1</sup>	22.7	22.7	ND	ND	ND
Terceira <sup>1</sup>	53.8	53.8	ND	ND	ND
Flores <sup>2</sup>	78.7	76.6	ND	2.1	ND
Total	<b>72.0</b>	<b>71.2</b>	<b>ND</b>	<b>0.2</b>	<b>0.6</b>
2020					
Santa Maria <sup>1,2</sup>	42.9	42.9	ND	ND	ND
São Jorge <sup>1</sup>	16.7	16.7	ND	ND	ND
Faial	25.0	25.0	ND	ND	ND
Terceira <sup>1</sup>	39.1	39.1	ND	ND	ND
Total	<b>31.5</b>	<b>31.5</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>

contrast, on islands where *N. ceranae* was established, the prevalence of *L. passim* was lower (Table 7; regression coefficient =  $-0.56$ ;  $z$  value =  $-2.03$ ;  $p < 0.01$ ). However, when island was included as covariable, the effect of *N. ceranae* on the presence of *L. passim* became statistically no significant (regression coefficient =  $-0.29$ ;  $z$  value =  $-0.66$ ;  $p = 0.51$ ) while the significance was kept for *V. destructor* (regression coefficient =  $1.06$ ;  $z$  value =  $2.15$ ;  $p = 0.03$ ).

## Discussion

The aim of this study was to assess the status of Trypanosomatidae species in honey bee colonies in Madeira and the Azores, and to determine whether the presence of *V. destructor* and *N. ceranae* on some islands influenced their distribution. Our results show that islands with the mite had a significantly

**Table 7** Number (and percentage) of *L. passim*-positive (+) and *L. passim*-negative (-) samples collected in 2014–2015 in the Azores distributed according to whether they were on islands where *V. destructor* or *N. ceranae* were present (+) or not (-)

	<i>L. passim</i> (+)	<i>L. passim</i> (-)	Total
<i>V. destructor</i> (+)	148 (81.32%)	34 (18.68%)	182 (100%)
<i>V. destructor</i> (-)	199 (66.11%)	102 (33.89%)	301 (100%)
<i>N. ceranae</i> (+)	263 (69.39%)	116 (30.61%)	379 (100%)
<i>N. ceranae</i> (-)	84 (80.77%)	20 (19.23%)	104 (100%)

higher prevalence of *L. passim*. Other studies had reported an association between them [32] even detecting DNA of this trypanosomatid in the acari, which is still of uncertain biological significance [33]. In contrast, when the island was included as covariable, no effect of *N. ceranae* on *L. passim* prevalence was observed as it was previously reported by other authors [14, 34]. However, a positive correlation between infection levels in colonies with both parasites has been also described [35].

Despite these differences related to the presence of *V. destructor* and *N. ceranae*, it is clear that trypanosomatids are well established in the Azores and Madeira, so that the strong restrictions on the introduction of honey bees on the *Varroa*-free islands of the Azores have not prevented the presence of trypanosomatids. Furthermore, *L. passim* is the main species found and the only identified in most of the colonies analysed. Interestingly, *C. mellificae*, the species associated with honey bees until the discovery of *L. passim* [8, 12], is not present in the territories analysed or is below our detection limit. Neither *C. acanthocephali* nor *C. expoeki* were detected in this study, although they could only have been confirmed by HTS as they were not analysed by qPCR.

This scenario where *L. passim* is the main trypanosomatid species in honey bee colonies seems to be repeated worldwide [13, 14, 28, 32, 35–39]. Given the high prevalence found herein and elsewhere, it is likely that *L. passim*, rather than *C. mellificae*, was the primary species infecting honey bees in studies conducted prior to its discovery [9–12]. Indeed, the frequencies observed and the absence of *C. mellificae* in many areas of the world corroborate the hypothesis that *L. passim* is a common parasite of *Apis mellifera* and that it is currently the dominant trypanosomatid species in adult worker bees [8, 13, 28, 39, 40]. On the other hand, *C. bombi* was identified in three islands and almost always coexisted with *L. passim* although it also appeared alone in some colonies. These results further confirm previous findings [41, 42], in which *C. bombi* was detected in honey bees.

How trypanosomatids entered the Azores is still unclear since the islands are located far from the mainland; the natural arrival of bees is not possible, so a human-made introduction was very probably. Although it could be that Pico was the point of entry, as it hosts the highest number of trypanosomatid-positive colonies and was also the point of entry

of *V. destructor* into the Azores, the data from Santa Maria, where neither *V. destructor* nor *Nosema* spp. are present [25] but where *L. passim* was detected in a large proportion of the colonies, do not support this hypothesis. The widespread distribution of *L. passim* on the Azorean islands that remain free of *V. destructor* strongly suggests that this species has been associated with *A. mellifera* since before the worldwide spread of the mite. A similar scenario was found in Hawaii archipelago, in which still has some islands where the mite is not present and where *L. passim* has been detected [19]. In New Zealand (*Varroa*-free until 2000), significant colony losses began to be observed in 2014 and an analysis of the surviving colonies revealed that most were infected with *L. passim* [15, 17, 18]. On the other hand, the presence of bumblebees in Madeira [43] and in the Azores [44] could explain the presence of *C. bombi* in honey bees due to feeding on common floral resources [45–47].

Our study supports that both sediment and supernatant phases are suitable for trypanosomatid detection. Also, the use of different technologies was key to identify all the species present in this area of Macaronesia. Thus, on the one hand, HTS technology allowed us to detect the haplotypes present but not all the species, as the cost of this tool limited the number of samples analysed ( $n=91$ ). On the other hand, the use of qPCR served to complement the analysis by allowing us to analyse the remaining trypanosomatid-positive samples ( $n=344$ ), which served to identify *C. bombi* present in lower prevalence. There is little data available on the population genetics of the *rpb1* in the trypanosomatids that infect honey bees or bumble bees. Recently, this gene was analysed and genetic polymorphisms were observed between *C. mellificae*, *C. bombi* and *L. passim* [26, 48, 49]. Our results are consistent with those obtained for the RPB1 gene in these three studies, indicating that there were two core haplotypes differing in only one nucleotide. It cannot be ruled out that the sequences found at low frequencies correspond to true rare haplotypes, although further experimental confirmation would be needed. Other genes like *18S rRNA*, *28S rRNA* and *its-2* have been studied to evaluate intraspecific variation, and their sequences were almost identical between the different strains of *L. passim*, with the exception of the virulence factor *gp63*, which seems to have a variable stretch between strains [40]. Therefore, it is possible that the *rpb1* does not have sufficient variation to distinguish strains, but that this may occur in other genes.

In conclusion, despite geographical isolation, trypanosomatids frequently infect colonies in Madeira and the Azores, even when there are restrictions on honey bee movements to mite-free islands. *L. passim* is the predominant Trypanosomatidae species, occurring as the only species in many colonies and showing a higher prevalence on islands with *V. destructor* and lower prevalence on islands with *N. ceranae*. Additionally, *C. bombi* also occurs, often co-occurring with *L. passim*. The detection of *L. passim* and *C. bombi* in areas

where *V. destructor* and *N. ceranae* are not present suggests that they have been associated with *A. mellifera* for much longer than originally thought.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02266-y>.

**Acknowledgements** The authors wish to thank V. Albendea, T. Corrales, M. Gajero, C. Uceta and M. Buendía of the Honey Bee Pathology Laboratory (CIAPA) and D. da Silva (Santiago de Compostela University). We are grateful to all veterinarians and technicians of the “Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural dos Açores” and “Divisão de Experimentação e Melhoria Agrícola, Direção Regional de Agricultura da Madeira” who collected the samples across the Azores and Madeira, namely Frank Aguiar, Nuno Salvador, Janyre Sousa, Ivan castro, Célia Mesquita, Ana Jorge, José Dias, Paulo Rico, Pedro Leal, Vagner Paulos, Luis Xavier, Luís Silva, Martins Silva, Carlos Gouveia, Ana Carina Coimbra, João Ramos, João Arruda, Edgardo Melo, João Luís, Moniz da Ponte and Berta Correia. Special thanks are due to Paula Vieira, Frank Aguiar and Berta Correia for coordinating the sampling in the Azores and Madeira.

**Author Contribution** Conceptualization: R.M.-H., M.A.P. and M.H.; methodology: all authors; formal analysis: all authors; investigation: D.A.-L., A.R.L. and S.K.S.; data curation: D.A.L.; writing—original draft preparation: D.A.-L. and R.M.-H.; writing—review and editing: D.A.-L., R.M.-H., C.B., X.M., M.A.P. and M.H.; supervision: R.M.-H.; project administration and funding acquisition: R.M.-H and M.A.P.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding** This work was funded by the Consejería de Educación, Cultura y Deportes, of the Junta de Castilla-La Mancha (European Regional Development Fund) Project No. SBPLY/19/180501/000334, and through the program COMPETE 2020—POCI (Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização) and FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) in the framework of the project BeeHappy (POCI-01-0145-FEDER-029871). INCRECYT program was funded by ESF/EC (European Social Funds). D.A.-L. contract was funded by the Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital (Grant No. PRE2018-084878, RTA2017-00004-C02-01). A.R.L. was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) through the individual research grant SFRH/BD/143627/2019. FCT provided financial support by national funds (FCT/MCTES) to CIMO (UIDB/00690/2020 and UIDP/00690/2020) and SusTEC (L.A/P/0007/2021).

**Data Availability** *Lotmaria passim* sequences obtained by HTS are available at Genbank (NCBI) data base. Total and valid reads generated by the MiSeq platform are available at Supplementary Table 1. Other datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

## References

1. Lopes HA (2010) Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitol J* 4:30–59. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010030>

2. Kaufers A, Ellis J, Stark D, Barratt J (2017) The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors* 10:287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
3. Langridge DF, McGhee RB (1967) *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *J Protozool* 14:485–487. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02033.x>
4. Lipa JJ, Triggiani O (1988) *Crithidia bombi* sp. n. a flagellated parasite of a bumble-bee *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae) 27:287–290
5. Meeus I, De Graaf DC, Jans K, Smaghe G (2010) Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *J Appl Microbiol* 109:107–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04635.x>
6. Schmid-Hempel R, Tognazzo M (2010) Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. *J Eukaryot Microbiol* 57:337–345. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00480.x>
7. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC et al (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* 6:e20656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
8. Schwarz RS, Baughan GR, Murphy CA et al (2015) Characterization of two species of Trypanosomatidae from the honey bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *J Eukaryot Microbiol* 62:567–583. <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>
9. Ravoet J, Maharramov J, Meeus I et al (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS One* 8:e72443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
10. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M et al (2013) Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environ Microbiol Rep* 5:74–77. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00385.x>
11. Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T (2013) Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecol Evol* 3:298–311. <https://doi.org/10.1002/ece3.464>
12. Cepero A, Ravoet J, Gómez-Moracho T et al (2014) Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Res Notes* 7:649. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-649>
13. Arismendi N, Bruna A, Zapata N, Vargas M (2016) PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. *J Invertebr Pathol* 134:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.008>
14. Stevanovic J, Schwarz RS, Vojnovic B et al (2016) Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *J Invertebr Pathol* 139:6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.001>
15. Hall RJ, Pragert H, Phiri BJ et al (2021) Apicultural practice and disease prevalence in *Apis mellifera*, New Zealand: a longitudinal study. *J Apic Res* 60:644–658. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1936422>
16. Yamamoto S, Nakamura S, Nakayama K et al (2023) Molecular detection of *Lotmaria passim* in honeybees in Japan. *Parasitol Int* 93:102711. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102711>
17. McFadden AMJ, Mackay J, Borowick O, Goodwin RM (2016) Investigation of bee mortality in a beekeeper operation in the Coromandel district. *Surveill* 43:9–11
18. Waters TL (2018) The distribution and population dynamics of the honey bee pathogens *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in New Zealand. Dissertation, Victoria University of Wellington

19. Szalanski AL, Trammel CE, Tripodi AD et al (2016) Molecular diagnostics of the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Crithidia spp.* (Trypanosomatidae) using multiplex PCR. *Florida Entomol* 99:793–795. <https://doi.org/10.1653/024.099.0438>
20. Padilla Alvarez F, Da Silva MJV, Cabanes FC et al (2001) Biometric study of *Apis mellifera* populations from central Portugal and Madeira. *Arch Zootec* 50:67–77
21. De La Rúa P, Galián J, Pedersen BV, Serrano J (2006) Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie* 37:699–708. <https://doi.org/10.1051/apido:2006044>
22. Ferreira H, Henriques D, Neves CJ et al (2020) Historical and contemporaneous human-mediated processes left a strong genetic signature on honey bee populations from the Macaronesian archipelago of the Azores. *Apidologie* 51:316–328. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00720-w>
23. Direção Regional da Agricultura (2022) Programa Sanitário Apícola. Direção Geral Aliment e Veterinária. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2022/07/ProgramaSanitarioApicola2022.pdf>. Accessed 21 Jul 2023
24. European Commission (2018) Commission implementing regulation (EU) 2021/620. 2016:48–119. [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2021/620/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/620/oj). Accessed 21 Jul 2023
25. Lopes AR, Martín-Hernández R, Higes M et al (2022) Colonisation patterns of *Nosema ceranae* in the Azores archipelago. *Vet Sci* 9:320. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070320>
26. Bartolomé C, Buendía-Abad M, Benito M et al (2020) Longitudinal analysis on parasite diversity in honeybee colonies: new taxa, high frequency of mixed infections and seasonal patterns of variation. *Sci Rep* 10:10454. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67183-3>
27. Lopes AR, Martín-Hernández R, Higes M, et al. (2023) First detection of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Macaronesian archipelago of Madeira. *J Apic Res* 1–4 <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2172835>
28. Buendía-Abad M (2022) Patogenicidad y virulencia de *Crithidia mellificae* y *Lotmaria passim* y nueva descripción del morfotipo haptomona en *Apis mellifera iberiensis*. Dissertation, Universidad Complutense de Madrid
29. Ranwez V, Harispe S, Delsuc F, Douzery EJP (2011) MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PLoS One* 6:e22594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022594>
30. Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
31. ESRI (2011) ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands
32. Castelli L, Branchiccela B, Invernizzi C et al (2019) Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *J Invertebr Pathol* 160:95–97. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.11.004>
33. Quintana S, Plischuk S, Brasesco C et al (2021) *Lotmaria passim* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in honey bees from Argentina. *Parasitol Int* 81:102244. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102244>
34. Buendía M, Martín-Hernández R, Ormosa C et al (2018) Epidemiological study of honeybee pathogens in Europe: the results of Castilla-La Mancha (Spain). *Spanish J Agric Res* 16:1–10. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-11474>
35. Vejnovic B, Stevanovic J, Schwarz RS et al (2018) Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol* 151:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.003>
36. Bordin F, Zulian L, Granato A et al (2022) Presence of known and emerging honey bee pathogens in apiaries of Veneto Region (Northeast of Italy) during Spring 2020 and 2021. *Appl Sci* 12:2134. <https://doi.org/10.3390/app12042134>
37. Mráz P, Hýbl M, Kopecký M et al (2021) Screening of honey bee pathogens in the Czech Republic and their prevalence in various habitats. *Insects* 12:1051. <https://doi.org/10.3390/insects12121051>
38. Xu G, Palmer-Young E, Skyrn K et al (2018) Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasitol Res* 117:623–628. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5733-2>
39. Williams MKF, Tripodi AD, Szalanski AL (2019) Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *J Apic Res* 58:553–558. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1568956>
40. Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T et al (2015) Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *J Invertebr Pathol* 130:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.06.007>
41. Bartolomé C, Buendía M, Benito M et al (2018) A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*. *J Invertebr Pathol* 154:37–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.03.015>
42. Oček MP, Toplak I, Zajc U, Bevk D (2021) The pathogens spillover and incidence correlation in bumblebees and honeybees in Slovenia. *Pathogens* 10:1–12. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070884>
43. Widmer A, Schmid-Hempel P, Estoup A, Scholl A (1998) Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity* (Edinb) 81:563–572. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6884070>
44. Prys-Jones OE, Williams PH, Carolan JC (2018) Bumblebees of the Azores (Apidae: *Bombus*). *J Nat Hist* 52:345–349. <https://doi.org/10.1080/00222933.2018.1432776>
45. Adler LS, Michaud KM, Ellner SP et al (2018) Disease where you dine: plant species and floral traits associated with pathogen transmission in bumble bees. *Ecology* 99:2535–2545. <https://doi.org/10.1002/ecy.2503>
46. Strobl V, Yañez O, Straub L et al (2019) Trypanosomatid parasites infecting managed honeybees and wild solitary bees. *Int J Parasitol* 49:605–613. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.03.006>
47. Arismendi N, Castro MP, Vargas M et al (2022) The trypanosome *Lotmaria passim* prevails in honey bees of different ages and stages of development. *J Apic Res* 61:63–69. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1828239>
48. Bartolomé C, Jabal-Uriel C, Buendía-Abad M et al (2021) Wide diversity of parasites in *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) revealed by a high-throughput sequencing approach. *Environ Microbiol* 23:478–483. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15336>
49. Bartolomé C, Buendía-Abad M, Ormosa C et al (2022) Bee trypanosomatids: first steps in the analysis of the genetic variation and population structure of *Lotmaria passim*, *Crithidia bombi* and *Crithidia mellificae*. *Microb Ecol* 84:856–867. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01882-w>

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



## Article

# Influence of Age of Infection on the Gut Microbiota in Worker Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis*) Experimentally Infected with *Nosema ceranae*

Daniel Aguado-López <sup>1,\*</sup>, Almudena Urbieto Magro <sup>1</sup>, Mariano Higes <sup>1</sup>, Juan Miguel Rodríguez <sup>2</sup> and Raquel Martín-Hernández <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Patología Apícola, Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA), Instituto Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario y Forestal (IRIAF), Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Camino de San Martín s/n, 19180 Marchamalo, Spain; almuena.urbieto@gmail.com (A.U.M.); mhiges@jccm.es (M.H.)

<sup>2</sup> Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain; jmrodrig@ucm.es

\* Correspondence: daguadol@jccm.es (D.A.-L.); rmhernandez@jccm.es (R.M.-H.)

**Abstract:** The gut microbiota of honey bees has received increasing interest in the past decades due to its crucial role in their health, and can be disrupted by pathogen infection. *Nosema ceranae* is an intracellular parasite that affects the epithelial cells of the midgut, altering gut homeostasis and representing a major threat to honey bees. Previous studies indicated that younger worker bees are more susceptible to experimental infection by this parasite, although the impact of infection and of age on the gut bacterial communities remains unclear. To address this, honey bees were experimentally infected with a consistent number of *N. ceranae* spores at various ages post-emergence (p.e.) and the gut bacteria 7 days post-infection (p.i.) were analysed using real-time quantitative PCR, with the results compared to non-infected controls. Infected bees had a significantly higher proportion and load of *Gilliamella apicola*. In respect to the age of infection, the bees infected just after emergence had elevated loads of *G. apicola*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bartonella apis*, and *Bombella apis*. Moreover, the *G. apicola* load was higher in bees infected at nearly all ages, whereas older non-infected bees had higher loads of *Bifidobacterium asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Ba. apis*, and *Bo apis*. These findings suggest that *N. ceranae* infection and, in particular, the age of bees at infection modulate the gut bacterial community, with *G. apicola* being the most severely affected species.

**Keywords:** microbiota; *Nosema*; honey bees; age of infection; qPCR; *Gilliamella apicola*



**Citation:** Aguado-López, D.; Urbieto Magro, A.; Higes, M.; Rodríguez, J.M.; Martín-Hernández, R. Influence of Age of Infection on the Gut Microbiota in Worker Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis*) Experimentally Infected with *Nosema ceranae*. *Microorganisms* **2024**, *12*, 635. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040635>

Academic Editor: Nancy Guillén

Received: 26 February 2024

Revised: 13 March 2024

Accepted: 20 March 2024

Published: 22 March 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Pluricellular organisms have been exposed to microorganisms constantly throughout their evolution, resulting in close co-evolutionary relationships between an organism's microbiota and the host. Consequently, diverse microbial communities are established in different host tissues, with the gastrointestinal tract being the site of highest microbial density and diversity [1]. The honey bee microbiota has received increasing attention in recent years, with studies attempting to address the mutualistic and pathogenic associations to better understand the intrinsic relationships with bee health [2–5]. Gut bacterial communities are less diverse in adult bees and these populations are very specialized, establishing stable, co-dependent symbiotic relationships that seem to be crucial for the animal's health and well-being. Furthermore, there is little variation between individuals within the same colony or between colonies, seasons, and geographical regions [6].

In the honey bee gut microbiota, eight bacterial taxa account for 95–99.9% of the 16S rRNA gene sequences in the gut [7–9]. Among them, five taxa appear to be found in all

bees and are considered to be the “core gut microbiome”, including *Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bombilactobacillus* spp. (previously Firm-4), and *Lactobacillus* spp. (previously Firm-5). The other three taxa are found in all colonies, but not in all bees: *Frischella perrara*, *Bartonella apis*, and *Bombella apis*. All of these bacteria are distributed differentially throughout the bee gut, such that *Bo. apis* can be found in the crop, and it is usually found in pollen, nectar, and hive materials [10,11]. Together with *Ba. apis*, this species is also found in the midgut [12]. As for the other bacteria, *F. perrara* is found in the pylorus [13], *G. apicola* and *S. alvi* in the ileum forming a biofilm [14,15], and *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., and *Lactobacillus* spp. in the rectum [16,17].

Through metamorphosis, honey bees pass through different developmental stages: larva, pupa, and adult. In the first stage, bacterial exchange may occur during the feeding of larvae [18], although the gut lining is then shed during pupation, resulting in almost complete elimination of any attached gut bacteria [19]. Hence, once metamorphosis is complete, the new adult bee lacks gut bacteria, yet when it gnaws through the operculum, it begins to acquire residual bacteria from the operculum and through contact with other hive elements and/or older bees [20,21]. Indeed, it is estimated that the characteristic gut microbiota of the bees is established by 7 days post-emergence (p.e.) and it remains constant in terms of bacterial diversity [14,22].

The honey bee microbiota plays many crucial roles in the host, promoting food digestion [23–25], enhancing host development [26], modulating behaviour [27], detoxifying pesticides [28], protecting against microplastics [29], enhancing the immune response, and protecting against parasites and pathogens [30–32]. Among the various pathogens infecting honey bees, *Nosema ceranae* is one of the most widely distributed worldwide [33–38]. This microsporidium is an obligate intracellular sporulating parasite that infects midgut cells, using the host’s machinery to obtain the resources it needs to proliferate and ultimately destroy the epithelial cells of this tissue [39,40]. Microsporidium infection alters the bee’s vital functions, causing energetic stress [41], disturbing immune responses [40,42,43], and altering olfaction, learning, orientation, and memory [44], as well as provoking digestive disorders. Overall, these problems lead to accelerated bee ageing [45] and they interfere with the tasks the bees must perform in the hive [46], ultimately augmenting mortality at the individual and colony levels [47].

*N. ceranae* mainly infects adult bees, although it has also been observed at other developmental stages [48,49]. Indeed, susceptibility to microsporidium infection appears to be influenced by the age of the bees. Field studies indicate that bees inside the colony can first be infected 4–5 days p.e., depending on the season [50], and that older worker bees have higher parasite loads [50–52]. However, both younger queens [53] and younger workers [54] are more susceptible to *N. ceranae* infection than older ones in experimental laboratory infections. These differences may be influenced by the gut microbiota [54], although there has been little research into this issue to date. In fact, *N. ceranae* infection can modify the relative abundance of some bacterial species [55–58] since altering the gut epithelium may modify how the gut microbiota is established. Therefore, the aim of this study was to shed light on this issue and to determine whether *N. ceranae* infection itself, and the age at which bees are infected, following a standard method for microsporidia infection, influences their gut bacterial communities.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Selection

The samples used in this study were a subset of the *Apis mellifera iberiensis* bees used in an earlier study [54] aimed at determining how the age of infection by *N. ceranae* affects the parasite load. In that study, potential colony-level influences were mitigated by obtaining capped brood frames from 5 healthy *Nosema*-free colonies (as confirmed by PCR testing). The frames were kept at 35 °C in an incubator to ensure a continuous supply of newly emerged *Nosema*-free honey bees of a known age. All of the newly emerged workers were carefully extracted from the brood combs each day and randomly placed in steel mesh

cages until infection. In this way, all of the bees in each cage were of the same age. The bees were fed ad libitum with a freshly prepared sucrose solution (50% w/w in dH<sub>2</sub>O) supplemented with 2% Promotor L<sup>®</sup> (Calier Lab., Les Franqueses del Vallès, Spain), a commercial mixture of amino acids and vitamins.

The bees were anaesthetised with CO<sub>2</sub> and when they started to wake up, they were infected (on day 0, 1, 4, 5, 8, 11, 13, or 14 p.e.) by administering 2 µL of a spore solution (57,000 spores/µL) purified on Percoll<sup>®</sup> 95% [59] from naturally infected bees into the mouthparts. The spore solution was vortexed after every third bee to ensure that the suspension remained uniform, and control bees of the same age were fed individually with 2 µL of spore-free water. At 7 days post-infection (p.i.), the number of surviving bees was recorded and they were sacrificed for molecular analysis. A total of 276 bee abdomens were analysed: infected (N = 215) and non-infected (N = 61) bees. The age and number of bees used to analyse the gut microbiota are shown in Table 1. It was confirmed that all bees in the infected group were positive for *N. ceranae* infection and those in the control group were not infected [54].

**Table 1.** Number of infected and non-infected bees analysed in each age cohort.

Age of Infection (Days p.e.)	0	1	4	5	8	11	13	14	Total
Age of Analysis (Days p.e.)	7	8	11	12	15	18	20	21	
Infected bees (N)	30	30	30	30	28	30	30	7	215
Non-infected bees (N)	11	10	6	6	10	6	6	6	61

## 2.2. Molecular Analysis

The abdomen of each bee was carefully separated from the thorax under sterile conditions to avoid contamination between samples, and DNA extraction was performed individually in a final volume of 100 µL as described previously [54]. In addition, the spore solution used as an inoculum to infect the bees was analysed to ensure it was free of gut bacteria.

The absolute abundance (bacterial load) of the main honey bee gut bacteria (*F. perrara*, *G. apicola*, *S. alvi*, *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., and *Ba. Apis*) was determined by real-time quantitative PCR (qPCR), targeting the 16S rRNA gene with previously described primers [23] and normalised to the host (*Apis mellifera*) cytochrome oxidase I (*Am-COI*) [60].

In addition, a primer pair and a probe were designed to detect and quantify *Bo. apis* (previously Alpha 2.2). The 16S rRNA gene sequences of *Bo. apis*, as well as *Parasaccharibacter apium* and *Saccharibacter floricola* that were both recently reclassified as *Bo. apis* [61], were obtained from GenBank (NCBI; Table S1) and aligned using ClustalW Multiple Alignment software (BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.6.1). A conserved fragment of 151 bp present in all of the available sequences was selected and analysed with Primer Express 3.0.1 software (Applied Biosystems Life Technologies Corp.; Foster City, CA, USA). For primer and probe design, the best primer pair and probe were selected based on the parameters determined by the software (stability, length, and % G/C), and they were provided by Roche Diagnostics (Basel, Switzerland). The probe chosen was modified by adding locked nucleic acids (LNAs) to increase the binding temperature to match that of the primers (Table 2).

**Table 2.** Primers and probe to detect and quantify the 16S rRNA gene of *Bo. apis* (Alpha 2.2): F, forward; R, reverse; P, probe. The LNAs (+) added to the probe are indicated.

Primers	Sequence (5'-3')	Size
ALPHA 2.2-F	CCGAGAGAGGGTTGTGGAATT	67 pb
ALPHA 2.2-R	AGATATTGGGAAGAACACCG	
ALPHA 2.2-P	6FAM-TGTAGA+GG+T+GAA+AT+TC-BHQ1	

All samples were tested individually and in duplicate in 384-well plates using a LightCycler<sup>®</sup>480 thermal cycler (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Negative controls were also tested in parallel for all qPCRs. Bacterial and *Am-COI* qPCR reactions were carried out in a final volume of 10  $\mu$ L LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), with each primer at 0.3  $\mu$ M and 1  $\mu$ L of the DNA template. The qPCR conditions involved: an initial denaturation of 5 min at 95  $^{\circ}$ C; 45 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 10 s, 60  $^{\circ}$ C for 10 s and 72  $^{\circ}$ C for 10 s; and a final cooling step of 30 s at 40  $^{\circ}$ C; a melting curve at 95  $^{\circ}$ C for 5 s; 1 min at 65  $^{\circ}$ C followed by cooling at 4  $^{\circ}$ C; and a final 30 s cooling step at 40  $^{\circ}$ C, to check that the amplicons obtained were of the expected size.

For *Bo. apis* qPCR, reactions were carried out duplicate in a final volume of 10  $\mu$ L containing 3.2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5  $\mu$ L LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 0.3  $\mu$ M each primer, 0.1  $\mu$ M probe, and 1  $\mu$ L DNA template. The PCR conditions involved an initial denaturation of 10 min at 95  $^{\circ}$ C; 45 cycles at 95  $^{\circ}$ C for 10 s, 60  $^{\circ}$ C for 30 s, and 72  $^{\circ}$ C for 1 s. The amplification cycle of each sample was analysed with the LightCycler<sup>®</sup> 480 c1.5.1 software (Roche Diagnostics) using the Second Derivate Maximum statistical algorithm to calculate the Crossing Point (Cp).

To quantify the bacterial load, synthetic double-stranded oligonucleotides (gBlock<sup>®</sup> Gene Fragment, IDT, DNA Technologies; Coralville, IA, USA) were designed from the reference sequences of the target gene for each of the bacterial species tested (Table S2). The synthetic DNAs were reconstituted according to the manufacturer's instructions and they were used to elaborate standard curves based on serial dilutions with known amounts of synthetic DNA encoding the target sequence. The copy number of the synthetic DNA was calculated from its molecular weight and the DNA concentration in the solution. Dilutions containing between 2 and 10<sup>8</sup> copies of synthetic DNA per  $\mu$ L were used to generate the standard curves. The limit of detection (LOD) for each bacterium was set according to the last Cp value (lowest DNA concentration) that generated an amplification signal. Thus, for *F. perrara*, *G. apicola*, and *S. alvi*, the LOD was set at 10<sup>2</sup> copies of DNA; for *B. asteroides*, *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., and *Ba. apis*, 10 copies were used as the LOD; and the LOD for *Bo. apis* was set at 2 copies. Bacterial targets for which the DNA copies were below the LOD were considered to be too low to be quantified and, therefore, they were considered negative and quantified as 0 copies. Primer efficiency (E) was estimated from the slope of the equation,  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ , and the characteristics of the primers and their performance are summarised in Table S3. Subsequently, the bacterial loads were normalised to the *Am-COI* gene copy number, and assessed with dilutions of synthetic *Am-COI* DNA contained between 10<sup>2</sup> and 10<sup>8</sup> copies. Samples for which the honey bee *COI* value was negative or less than 10<sup>5</sup> copies were excluded from the analysis as the DNA extracted was considered to be of poor quality.

Normalisation to the *Am-COI* gene was performed for all samples to reduce the variation in gut size and DNA extraction efficiency. The copy number of the *16S rRNA* gene of each bacterium was determined as described previously [23]. First, the raw copy number ( $n_{\text{raw}}$ ) of each target was calculated in 1  $\mu$ L of DNA (the volume used in each qPCR reaction) based on the Cp automatically extrapolated to the standard curve using the thermal cycler software mentioned above. The raw copy number was then normalised by dividing it by the number of *Am-COI* gene copies present in the sample ( $n_{\text{COI}}$ ), which was determined in the same way. This normalised *16S rRNA* gene copy value was then multiplied by the median *Am-COI* gene copy number of all samples and the total volume of the DNA extracted (i.e., 100  $\mu$ L) to obtain the normalised copy numbers per abdomen ( $n_{\text{abs}}$ ):  $n_{\text{abs}} = (n_{\text{raw}} / n_{\text{COI}}) \times \text{median}(n_{\text{COI}}) \times 100$ . Once the data were normalised, they were converted to a logarithmic scale for statistical analysis and all the values considered as 0 copies were replaced by 1 for the logarithmic transformations.

### 2.3. Statistical Analysis

To determine whether *N. ceranae* infection had any effect on the presence of any bacterial group, a chi-squared test with Yates correction was performed for each of the

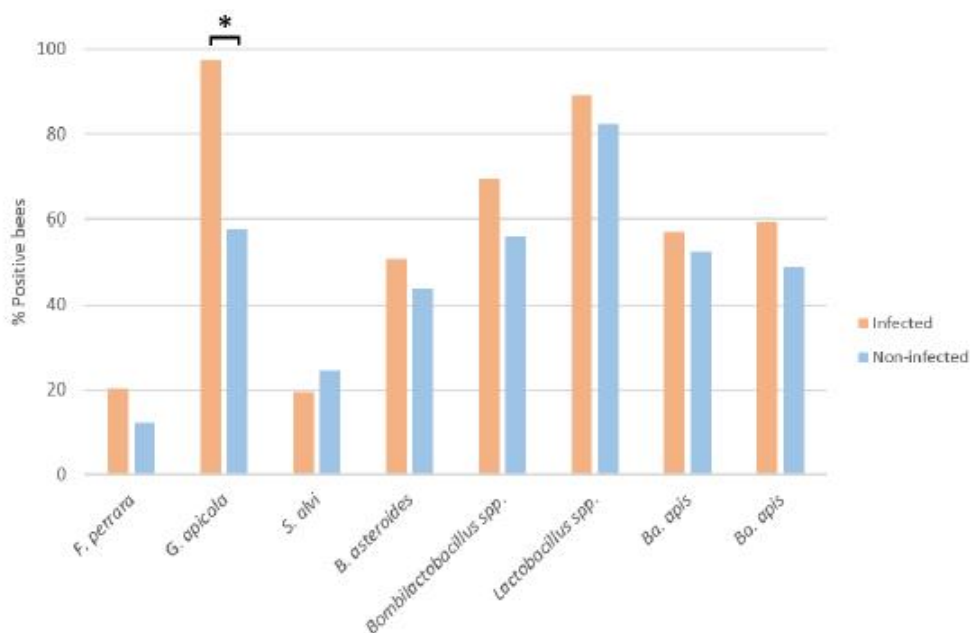
bacterial species analysed. In addition, in *Nosema*-infected and non-infected bees, the bacterial load of each species tested was compared using the Games–Howell (GH) post hoc test. The bacterial load of infected and non-infected bees was compared in each age cohort using the non-parametric Mann–Whitney (MW) test to assess whether the age of infection with *N. ceranae* produced differences in the load of any bacterial group. All analyses were carried out using IBM® SPSS® Statistics 25.0 software, considering values of  $p < 0.05$  as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Influence of *N. ceranae* Infection on the Honey Bee Gut Bacteria

In order to determine whether the species of gut bacteria and their load differed in infected and non-infected bees, 13 samples (9 infected and 4 non-infected bees) out of the 276 bee abdomens available were excluded from the analysis due to the lack of amplification or because they were below the LOD for *Am-COI* established. The spore solution used to infect the bees was negative for all of the bacterial species assessed in this study, indicating that the infected bees were not inoculated with gut bacteria.

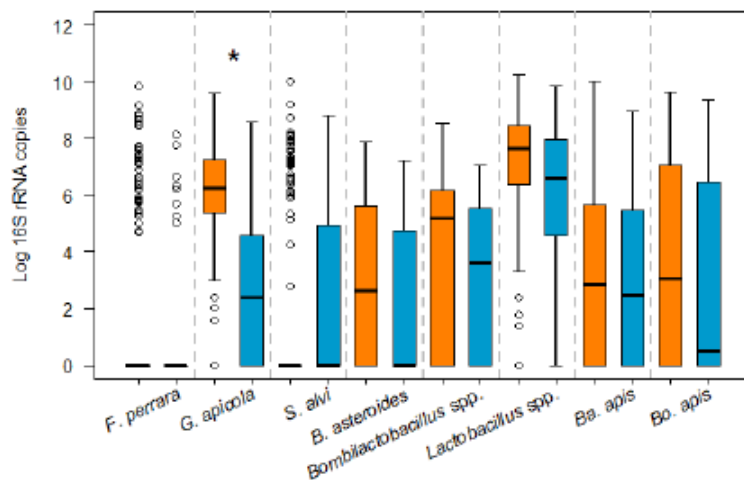
The proportions of infected and non-infected bees positive for each bacterium analysed were established (Figure 1). In the infected bees, there was an increase in the presence of almost all bacterial species relative to the non-infected bees. However, after the chi-squared test, only *G. apicola* was in a significantly higher proportion of infected bees ( $X^2 = 67,658$ ;  $p < 0.0001$ ). The proportions with the remaining bacterial species did not differ significantly between the groups: *F. perrara* ( $X^2 = 1.44$ ;  $p = 0.230$ ), *S. alvi* ( $X^2 = 0.13$ ;  $p = 0.716$ ), *B. asteroides* ( $X^2 = 0.641$ ;  $p = 0.423$ ), *Bombilactobacillus* spp. ( $X^2 = 2.964$ ;  $p = 0.085$ ), *Lactobacillus* spp. ( $X^2 = 1.38$ ;  $p = 0.240$ ), *Ba. apis* ( $X^2 = 0.226$ ;  $p = 0.634$ ), and *Bo. apis* ( $X^2 = 1.469$ ;  $p = 0.225$ ).



**Figure 1.** Percentage (%) of bees positive for each gut bacterial species in infected and non-infected bees, irrespective of age. \* Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

Regarding the absolute abundance of each of the bacterial species per bee abdomen, only *G. apicola* was found at a significantly higher load in infected bees (Figure 2; GH,

$p = 0.0001$ ). For the other bacterial species, although their abundance was higher in infected bees, except for *S. alvi*, the differences between the infected and non-infected bees were not significant.



**Figure 2.** Box-plots showing the absolute abundance of the 16S rRNA genes for the different gut bacteria analysed in *N. ceranae*-infected (orange) and non-infected bees (blue). The line represents the median, while the box represents 50% of the observations and the whiskers reach the interquartile range of 1.5 $\times$ . When the distribution of samples does not enable boxes to be established, the bacteria are represented by circles. For pairwise comparisons, the Games–Howell post hoc test was used: \*  $p < 0.05$ .

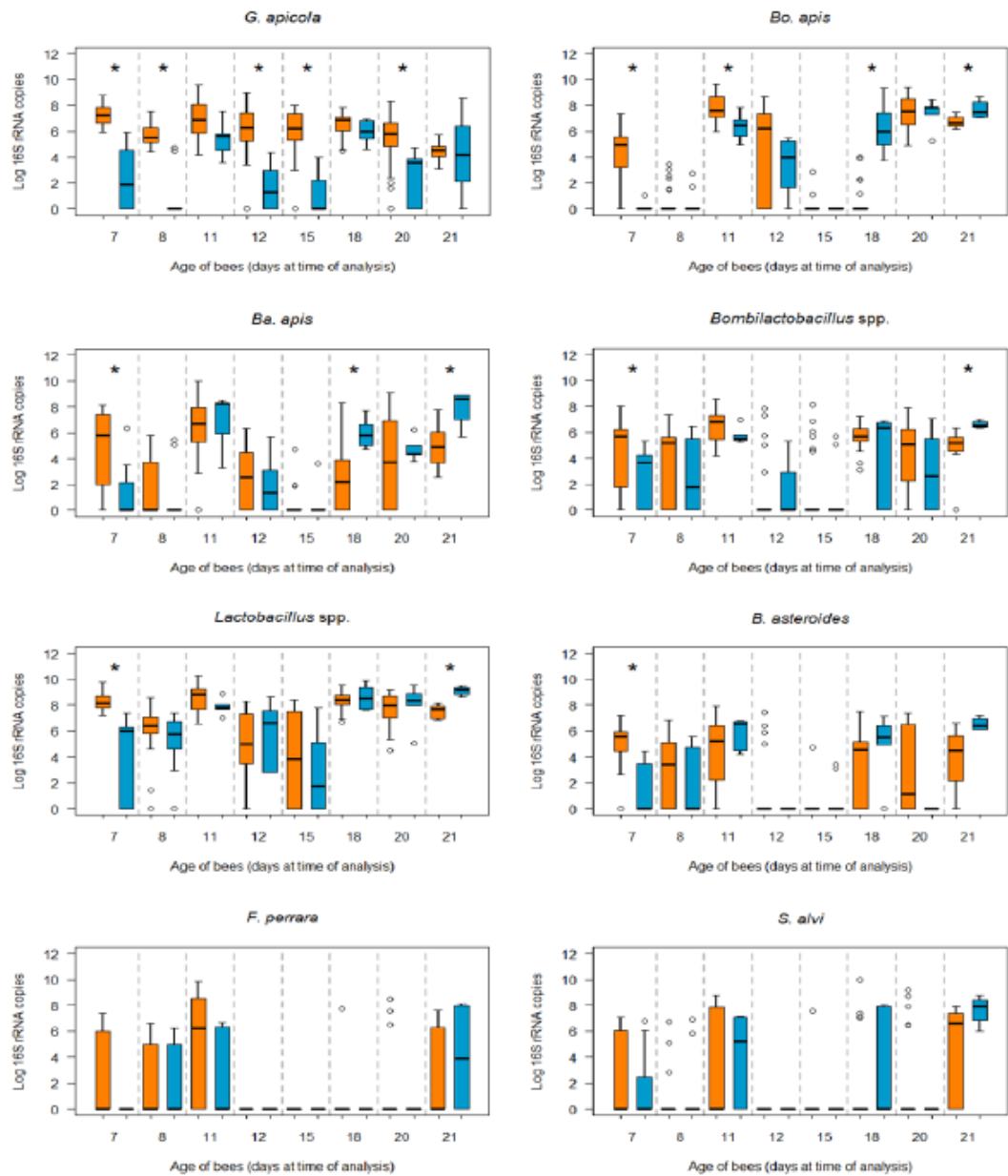
### 3.2. Bacterial Loads in Infected and Non-Infected Honey Bees of the Same Age

When the bacterial loads were compared between infected and non-infected bees of the same age, additional differences were observed (Figure 3). Due to the lack of amplification of *Am-COI* (see above), the total number of honey bees analysed in each age cohort is shown in Table 3. *G. apicola* was the one species for which significantly higher bacterial loads were detected in infected bees at almost all ages (7, 8, 12, 15, and 20 days p.e.) studied relative to non-infected bees (MW,  $p = 0.0001$ ; MW,  $p = 0.0001$ ; MW,  $p = 0.001$ ; MW,  $p = 0.0001$ ; MW,  $p = 0.006$ , respectively).

**Table 3.** Number of honey bees included in the statistical analysis.

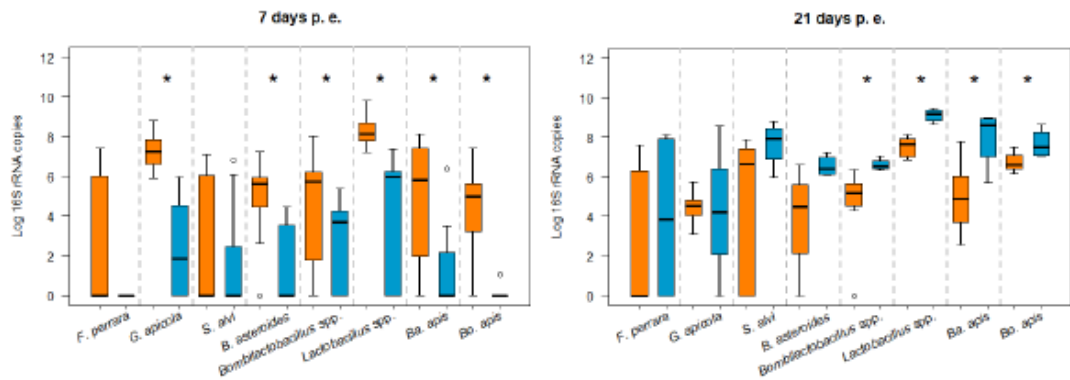
Age of Infection (Days p.e.)	0	1	4	5	8	11	13	14	Total
Age of Analysis (Days p.e.)	7	8	11	12	15	18	20	21	
Infected bees (N)	28	30	27	27	27	30	30	7	206
Non-infected bees (N)	11	10	5	6	10	6	5	4	57

The bacterial load of *Bo. apis* was significantly higher at 7 (MW,  $p = 0.007$ ) and 11 days p.e. in infected bees (MW,  $p = 0.01$ ), yet from 18 days p.e., the *Bo. apis* load was significantly higher in non-infected bees of this age (MW,  $p = 0.0001$ ) and at 21 days p.e. (MW,  $p = 0.007$ ). The same occurred for *Ba. apis*, which was significantly more abundant at 7 days p.e. in infected bees (MW,  $p = 0.02$ ) and in non-infected bees at 18 and 21 days p.e. (MW,  $p = 0.001$ ; MW,  $p = 0.02$ , respectively). The same trend was evident for the *Bombilactobacillus* spp. and *Lactobacillus* spp., with significantly higher bacterial loads in the younger infected (MW,  $p = 0.018$ ; MW,  $p = 0.0001$ , respectively) and older non-infected bees (MW,  $p = 0.01$ ; MW,  $p = 0.006$ , respectively). No significant differences in bacterial loads were observed for *F. perrara* and *S. alvi* between infected and non-infected bees at any age.



**Figure 3.** Box-plots showing the absolute copy number abundance of the 16S rRNA gene for the different gut bacteria analysed in *N. ceranae*-infected (orange) and non-infected (blue) bees at each age, from the highest to lowest differences. The line represents the median, while the box represents 50% of the observations and the whiskers reach the interquartile range of 1.5 $\times$ . When the distribution of samples does not enable boxes to be established, the bacteria are represented by circles. The Mann–Whitney test was used for pairwise comparisons: \*  $p < 0.05$ .

When we show all of the bees grouped by age, newly emerged infected bees (7 days old at the time of analysis) had higher bacterial loads than non-infected bees, with significant differences for *G. apicola* (MW,  $p = 0.0001$ ), *B. asteroides* (MW,  $p = 0.0001$ ), *Bombilactobacillus* spp. (MW,  $p = 0.018$ ), *Lactobacillus* spp. ( $p = 0.0001$ ), *Ba. apis* (MW,  $p = 0.003$ ), and *Bo. apis* (MW,  $p = 0.0001$ ; Figure 4).



**Figure 4.** Box-plots showing the absolute abundance of 16S rRNA gene copy number of the different gut bacteria analysed in 7-day-old (left) and 21-day-old (right) *N. ceranae*-infected (orange) and non-infected bees (blue). The line represents the median, while the box represents 50% of the observations and the whiskers reach the interquartile range of 1.5 $\times$ . When the distribution of samples does not enable boxes to be established, the bacteria are represented by circles: \*  $p < 0.05$ .

In addition, the oldest non-infected bees in the study (21 days old at the time of analysis) had significantly higher loads of *Ba. apis* (MW,  $p = 0.02$ ), *Bo. apis* (MW,  $p = 0.007$ ), *Bombilactobacillus* spp., and *Lactobacillus* spp. than infected bees of the same age (Figure 4). However, it should be highlighted that the 21-day-old bees in the group of non-infected bees had the least number of bees available ( $n = 4$ ). Regarding the rest of the ages (8–20 days p.e.), apart from *G. apicola* that was already seen to be the bacteria most significantly influenced by infection, the bacterial load between infected and non-infected bees was only significantly different for *Bo. apis* at 11 and 18 days p.e. (MW,  $p = 0.01$ ; MW,  $p = 0.0001$ , respectively) and *Ba. apis* at 18 days p.e. (MW,  $p = 0.001$ ). However, while there were no significant differences for the other days, the mean bacterial load in the *N. ceranae*-infected bees was higher than in the non-infected bees, mainly on days 8 and 11 p.e. (Figure S1).

#### 4. Discussion

The main objective of this work was to determine whether experimental infection with *N. ceranae* and the age at which the bees are infected influence the main taxa that constitute the honey bee gut microbiota. As such, we studied the main bacterial taxa that represent 95–99% of the honey bee gut bacteriome, showing that of all species tested, *G. apicola* was the species most significantly affected by microsporidium infection, both in terms of presence and bacterial load. This positive association between *G. apicola* and experimental *N. ceranae* infection seems to be very common, as it was found by other authors [56,58,62–64] in trials conducted under very different conditions, addressing infection at different ages, different honey bee subspecies, distinct spore doses, gut regions examined, diets fed, analytical methods, or through the analysis of individual bees or pooled samples. However, others failed to find any association between *N. ceranae* infection and this bacterium or with any other bacteria [65], while other studies found associations with other bacteria like those of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Snodgrassella*, or *Bartonella* [61,62,66–69], which did not appear to be modified here. Most of these studies used very young bees (24–48 h p.e.) and a few slightly older bees (5 d p.e.); however, no study approached the

effect of age on the relationship between microbiota and infection, and even this factor is usually not taken into account when comparing results between studies. Nonetheless, our work demonstrates that it is important to take this factor into account, as the results vary depending on the age at which infection occurs.

To assess the impact of the age at which bees are infected on the gut bacteriome, we performed a comparative analysis of infected and non-infected bees of the same ages. Significant differences between infected and non-infected bees were evident at two key time points, coinciding with the youngest and oldest bees in the trial. Thus, the bees infected just after emergence (7 days old at the time of analysis) had significantly higher bacterial loads for all of the taxa tested, except for *F. perrara* and *S. alvi*, whereas there was a higher abundance of *Bombilactobacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Ba. apis*, and *Bo. apis* in non-infected 21-day-old bees. In the intermediate period, between 8 and 20 days p.e., only occasional differences in bacterial load were observed for any species between infected and non-infected bees, except for *G. apicola*, which was more abundant in *N. ceranae*-infected bees at most ages studied.

It is worth noting that in the work that led to the present research [54], all infected bees were microsporidium-positive; however, 7- and 8-day-old bees (infected at 0 and 1 day p.e.) were much more susceptible to *N. ceranae* infection. This may be because newly emerged bees do not have well-developed peritrophic membranes [68] and the absence of this physical barrier may favour the infection of midgut epithelial cells. Although there were no significant differences in the 8-day-old bees studied here, this trend was similar to that on the previous day. The same was true for bees between 18 and 20 days old in which there were no significant differences, but the tendency towards a higher load of some bacteria for non-infected bees was similar to that on day 21, which was significant. Hence, *N. ceranae* infection apparently alters gut bacteria (in one sense or another depending on age of infection), possibly due to damage to the midgut epithelium. Studying a higher sampling size than that used here (mainly for non-infected bees) may produce more robust results and a clearer differentiation.

In this study, *G. apicola* was consistently the species most strongly influenced by *Nosema* infection. Its increased prevalence and abundance in the gut has previously been associated with gut dysbiosis and host deficiencies [16,69–71]. The increase in this species and of other non-core bacteria appears to displace the establishment of other core gut bacteria like *S. alvi* [12,16], reducing the protective function of the biofilm that these two species form in the ileum, which, in turn, has been strongly associated with poor host development and early mortality. In fact, *S. alvi* appears at a low frequency in our assay, consistent with the higher prevalence and load of *G. apicola*. Therefore, the increase in this species could be a marker of gut dysbiosis, as suggested previously [16].

On the other hand, the lesions produced by *N. ceranae* in the midgut of bees 7 days after infection (such as the bees study here that were sacrificed 7 days after infection regardless of their age), with signs of degeneration in most epithelial cells [39,72], could affect midgut function and negatively affect food digestion and nutrient absorption [73–75]. Therefore, the sucrose from the food, which is hydrolysed into glucose and fructose by a sucrase secreted by the hypopharyngeal glands [76], would not be correctly absorbed by the injured midgut epithelium, and would pass into the ileum and rectum. This would also be the case with amino acids and vitamins, where they could then be utilised by gut bacteria as a substrate [77,78], potentially producing a further imbalance in the gut microbiota. Moreover, several other effects of *N. ceranae* infection already described could contribute to the altered digestive tract homeostasis, such as those affecting the regulation of antioxidant systems, reducing reactive oxygen species (ROS) production [39,79,80], or enhancing immunosuppression by inhibiting the production of antimicrobial peptides (AMPs) [42,65,81]. Indeed, microsporidia infection in other insects induces acidification and increased ROS in the hindgut, reducing bacterial diversity and affecting the structure of the gut bacterial community [82]. Therefore, by disrupting the gut ecosystem, possibly

through changes in AMPs, ROS, or pH, *N. ceranae* could influence bacterial communities. Here, all of these imbalances produce either an increase or a decrease in bacterial species.

In this way, the non-absorption of sugars in the midgut and their passage to the ileum could explain why infected bees have more abundant bacteria. In addition, *G. apicola* is one of the first bacteria to colonise the ileum, and it can utilise glucose and fructose simultaneously [83], possessing complete metabolic pathways for the utilisation of all amino acids [84]. As a result, this species will benefit from the influx of these nutrients, explaining why it is one of the bacterial species most influenced by microsporidium infection in this study.

Our work shows that the age at which bees become infected with *N. ceranae* has a clear influence on the gut bacteriome. Thus, newly emerged bees receive the microsporidium and the gut microbiota at virtually the same time, or within a few hours of each other. By contrast, all of the other bees already had certain bacteria in their digestive tract at the time of infection, and the stability of these bacteria in the gut is age-dependent. Indeed, bees infected at 24 h p.e. still do not have a well-established microbiota, whereas those infected at 14 days p.e. have a more established microbiota [14,15]. Nevertheless, it is noteworthy that these results were obtained under laboratory conditions and, evidently, they differ from field conditions. In fact, honey bees become naturally infected by *N. ceranae* between 4 and 5 days p.e. inside the colony [50], and in the studies carried out under field conditions, there is less disparity in the gut microbiota of bees relative to infection. The effects reported range from no difference between infected and non-infected bees [85] to a higher abundance of bifidobacteria in *N. ceranae*-infected bees [57] or of *Bartonella* in honey bees with high infection levels [86]. The bees in these studies had developed part of their life inside the colony, allowing them to naturally acquire their characteristic gut microbiota. From the moment a new worker emerges, there are multiple ways in which they acquire and develop their microbiota, such as contact with elements in the hive, interactions with other older bees, and the consumption of natural foods, among others [21], which, of course, are limited in laboratory assays. Therefore, it is plausible that the microbiota has already begun to be established when the bees are naturally infected and, therefore, susceptibility to infection may differ from that of bees experimentally infected in the laboratory and kept in the lab throughout the assay.

Nevertheless, most of the bees in our study possessed the main characteristic bacterial taxa in their guts despite not having developed their natural life cycle inside the hive, but, rather, having acquired these bacteria through contact with the brood frame in the first 24 h after emergence, with *S. alvi* being a notable exception. Special care was taken to ensure that the *N. ceranae* spore inoculum did not bias the study, providing the bees of the infected group with gut bacteria. In fact, qPCR analysis of the spore inoculum indicated that it was free of the bacterial species studied, such that only *N. ceranae* spores were administered to the bees. In other words, the bacteria detected in this study could only have been acquired through contact with the brood frame. These results indicate that natural emergence and brief exposure to the brood frame is sufficient to acquire microbiomes very similar to those found in the hive environment, as described previously [21,87].

## 5. Conclusions

This study revealed that *N. ceranae* infection, irrespective of age, seems to have a notable impact on the composition of the honey bee gut microbiota, with *G. apicola* being the bacterium most profoundly affected both in terms of presence and bacterial load. Moreover, the age of infection was confirmed to be an important factor to be considered in these studies, as the age at which the bees were infected with microsporidium influenced the abundance of gut bacterial species. Younger infected bees have a higher abundance of virtually all of the bacterial species analysed, while the same occurred for some bacteria in older non-infected bees.

Thus, our results clearly show that the microsporidia *N. ceranae* can alter the gut microbiota of honey bees under laboratory conditions. It would therefore be interesting to

further study the interactions between the microsporidian and the gut microbiota with the aim of finding a possible solution to the negative effects of this widespread pathogen on honey bees.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms12040635/s1>, Table S1: GenBank (NCBI) accession numbers for primer and probe design for the detection and quantification of *Bombella apis*; Table S2: The gBlock® Gene Fragment ordered for the bacterial *16S rRNA* gene and the *Apis mellifera COI* gene. The primers (red) and probes (blue) annealing regions are indicated in bold and underlined; Table S3: Primers used in this study for the bacterial *16S rRNA* gene and the *Apis mellifera COI* gene and standard curve characteristics. LOD refers to the limit of detection of primer sets, expressed as the lowest number of DNA copies detected when standard curves were performed. F: Forward; R: Reverse; P: probes; Tm: Melting temperature; Figure S1: Box-plots showing the absolute abundance of *16S rRNA* gene copy number of the different gut bacteria analysed in *N. ceranae* infected and non-infected bees at each age. The line represents the median, while the box represents 50% of the observations and the whiskers reach the interquartile range of 1.5×. Cases where the distribution of samples does not allow for boxing are represented by circles. For pairwise comparisons, the Mann–Whitney test was used. \*  $p < 0.05$ .

**Author Contributions:** Conceptualization: R.M.-H., A.U.M., D.A.-L. and J.M.R.; methodology: all authors; formal analysis: M.H. and D.A.-L.; investigation: D.A.-L. and R.M.-H.; data curation: D.A.-L.; writing—original draft preparation: D.A.-L., R.M.-H., M.H. and J.M.R.; writing—review and editing: D.A.-L. and R.M.-H.; supervision: R.M.-H.; project administration and funding acquisition: R.M.-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Consejería de Educación, Cultura y Deportes, of the Junta de Castilla—La Mancha (European Regional development Fund) project No. SBPLY/19/180501/000334. D.A.-L. contract funded by the Ministerio de Asuntos Económicos y Transformación Digital (Grant no. PRE2018-084878, RTA2017-00004-C02-01).

**Institutional Review Board Statement:** Ethical review and approval were waived for this study, in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, which among invertebrates is only considered to be applicable to cephalopods. Therefore, no permits were required for experimentation on bees, although all bees were treated according to animal welfare standards to avoid any animal suffering when possible.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The authors want to thank the team at the Laboratorio de Patología Apícola (D. de la Plaza, J. García, V. Albendea, T. Corrales, M. Gajero, C. Ueeta, M. Buendía, M. Benito, C. Jabal, and S. Sagastume), the Centro de Investigación Apícola y Agroambiental (CIAPA-IRIAF), and the Junta de Comunidades de Castilla—La Mancha (Spain) for their technical help and support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Kostic, A.D.; Howitt, M.R.; Garrett, W.S. Exploring Host-Microbiota Interactions in Animal Models and Humans. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 701–718. [CrossRef] [PubMed]
2. Cox-Foster, D.L.; Conlan, S.; Holmes, E.C.; Palacios, G.; Evans, J.D.; Moran, N.A.; Quan, P.L.; Briese, T.; Hornig, M.; Geiser, D.M.; et al. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* **2007**, *318*, 283–287. [CrossRef] [PubMed]
3. Evans, J.D.; Spivak, M. Socialized Medicine: Individual and Communal Disease Barriers in Honey Bees. *J. Invertebr. Pathol.* **2010**, *103*, S62–S72. [CrossRef] [PubMed]
4. Engel, P.; Kwong, W.K.; McFrederick, Q.; Anderson, K.E.; Barribeau, S.M.; Chandler, J.A.; Comman, R.S.; Dainat, J.; De Miranda, J.R.; Doublet, V.; et al. The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio* **2016**, *7*, e02164-15. [CrossRef] [PubMed]
5. Zheng, H.; Steele, M.L.; Leonard, S.P.; Motta, E.V.S.; Moran, N.A. Honey Bees as Models for Gut Microbiota Research. *Lab Anim.* **2018**, *47*, 317–325. [CrossRef] [PubMed]

6. Kwong, W.K.; Medina, L.A.; Koch, H.; Sing, K.-W.; Soh, E.J.Y.; Ascher, J.S.; Jaffé, R.; Moran, N.A. Dynamic Microbiome Evolution in Social Bees. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1600513. [CrossRef] [PubMed]
7. Martinson, V.G.; Danforth, B.N.; Minckley, R.L.; Rueppell, O.; Tingek, S.; Moran, N.A. A Simple and Distinctive Microbiota Associated with Honey Bees and Bumble Bees. *Mol. Ecol.* **2011**, *20*, 619–628. [CrossRef] [PubMed]
8. Moran, N.A. Genomics of the Honey Bee Microbiome. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, *10*, 22–28. [CrossRef]
9. Su, Q.; Tang, M.; Hu, J.; Tang, J.; Zhang, X.; Li, X.; Niu, Q.; Zhou, X.; Luo, S.; Zhou, X. Significant Compositional and Functional Variation Reveals the Patterns of Gut Microbiota Evolution among the Widespread Asian Honeybee Populations. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 934459. [CrossRef]
10. Anderson, K.E.; Sheehan, T.H.; Mott, B.M.; Maes, P.; Snyder, L.; Schwan, M.R.; Walton, A.; Jones, B.M.; Corby-Harris, V. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83125. [CrossRef]
11. Corby-Harris, V.; Maes, P.; Anderson, K.E. The Bacterial Communities Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Foragers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e95056. [CrossRef] [PubMed]
12. Ludvigsen, J.; Rangberg, A.; Avershina, E.; Sekelja, M.; Kræibich, C.; Amdam, G.; Rudi, K. Shifts in the Midgut/Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. *Microbes Environ.* **2015**, *30*, 235–244. [CrossRef] [PubMed]
13. Engel, P.; Bartlett, K.D.; Moran, N.A. The Bacterium *Frischella perrara* Causes Scab Formation in the Gut of Its Honeybee Host. *mBio* **2015**, *6*, e00193-15. [CrossRef] [PubMed]
14. Martinson, V.G.; Moy, J.; Moran, N.A. Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2830–2840. [CrossRef] [PubMed]
15. Powell, J.E.; Leonard, S.P.; Kwong, W.K.; Engel, P.; Moran, N.A. Genome-Wide Screen Identifies Host Colonization Determinants in a Bacterial Gut Symbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 13887–13892. [CrossRef] [PubMed]
16. Maes, P.W.; Rodrigues, P.A.P.; Oliver, R.; Mott, B.M.; Anderson, K.E. Diet-Related Gut Bacterial Dysbiosis Correlates with Impaired Development, Increased Mortality and *Nosema* Disease in the Honeybee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* **2016**, *25*, 5439–5450. [CrossRef]
17. Anderson, K.E.; Ricigliano, V.A. Honey Bee Gut Dysbiosis: A Novel Context of Disease Ecology. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2017**, *22*, 125–132. [CrossRef]
18. Vojvodic, S.; Rehan, S.M.; Anderson, K.E. Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72106. [CrossRef]
19. Engel, P.; Moran, N.A. Functional and Evolutionary Insights into the Simple yet Specific Gut Microbiota of the Honey Bee from Metagenomic Analysis. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 60–65. [CrossRef] [PubMed]
20. Koch, H.; Abrol, D.P.; Li, J.; Schmid-Hempel, P. Diversity and Evolutionary Patterns of Bacterial Gut Associates of Corbiculate Bees. *Mol. Ecol.* **2013**, *22*, 2028–2044. [CrossRef] [PubMed]
21. Powell, J.E.; Martinson, V.G.; Urban-Mead, K.; Moran, N.A. Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 7378–7387. [CrossRef] [PubMed]
22. Kapheim, K.M.; Rao, V.D.; Yeoman, C.J.; Wilson, B.A.; White, B.A.; Goldenfeld, N.; Robinson, G.E. Caste-Specific Differences in Hindgut Microbial Communities of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123911. [CrossRef] [PubMed]
23. Kešnerová, L.; Mars, R.A.T.; Ellegaard, K.M.; Troilo, M.; Sauer, U.; Engel, P. Disentangling Metabolic Functions of Bacteria in the Honey Bee Gut. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2003467. [CrossRef] [PubMed]
24. Zheng, H.; Perreau, J.; Powell, J.E.; Han, B.; Zhang, Z.; Kwong, W.K.; Tringe, S.G.; Moran, N.A. Division of Labor in Honey Bee Gut Microbiota for Plant Polysaccharide Digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 25909–25916. [CrossRef] [PubMed]
25. Li, C.; Tang, M.; Li, X.; Zhou, X. Community Dynamics in Structure and Function of Honey Bee Gut Bacteria in Response to Winter Dietary Shift. *mBio* **2022**, *13*, e01131-22. [CrossRef] [PubMed]
26. Zheng, H.; Powell, J.E.; Steele, M.L.; Dietrich, C.; Moran, N.A. Honeybee Gut Microbiota Promotes Host Weight Gain via Bacterial Metabolism and Hormonal Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4775–4780. [CrossRef] [PubMed]
27. Jones, J.C.; Fruciano, C.; Marchant, J.; Hildebrand, F.; Forslund, S.; Bork, P.; Engel, P.; Hughes, W.O.H. The Gut Microbiome Is Associated with Behavioural Task in Honey Bees. *Insectes Soc.* **2018**, *65*, 419–429. [CrossRef]
28. Wu, Y.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Wang, S.; Chen, Y.; Hu, E.; Zheng, H. Honey Bee (*Apis mellifera*) Gut Microbiota Promotes Host Endogenous Detoxification Capability via Regulation of P450 Gene Expression in the Digestive Tract. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 1201–1212. [CrossRef]
29. Wang, K.; Li, J.; Zhao, L.; Mu, X.; Wang, C.; Wang, M.; Xue, X.; Qi, S.; Wu, L. Gut Microbiota Protects Honey Bees (*Apis mellifera* L.) against Polystyrene Microplastics Exposure Risks. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *402*, 123828. [CrossRef]
30. Engel, P.; Martinson, V.G.; Moran, N.A. Functional Diversity within the Simple Gut Microbiota of the Honey Bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 11002–11007. [CrossRef]
31. Schwarz, R.S.; Huang, Q.; Evans, J.D. Hologenome Theory and the Honey Bee Pathosphere. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, *10*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
32. Steele, M.L.; Motta, E.V.S.; Gattu, T.; Martinez, D.; Moran, N.A. The Gut Microbiota Protects Bees from Invasion by a Bacterial Pathogen. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e00394-21. [CrossRef] [PubMed]

33. Higes, M.; Martín-Hernández, R.; Garrido-Bailón, E.; Botías, C.; García-Palencia, P.; Meana, A. Regurgitated Pellets of *Merops apiaster* as Fomites of Infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) Spores. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 1374–1379. [CrossRef] [PubMed]
34. Stevanovic, J.; Stanimirovic, Z.; Genersch, E.; Kovacevic, S.R.; Ljubenkovic, J.; Radakovic, M.; Aleksic, N. Dominance of *Nosema ceranae* in Honey Bees in the Balkan Countries in the Absence of Symptoms of Colony Collapse Disorder. *Apidologie* **2011**, *42*, 49–58. [CrossRef]
35. Yoshiyama, M.; Kimura, K. Distribution of *Nosema ceranae* in the European Honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **2011**, *106*, 263–267. [CrossRef] [PubMed]
36. Martínez, J.; Leal, G.; Conget, P. *Nosema ceranae* an Emergent Pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 601–607. [CrossRef]
37. Guerrero-Molina, C.; Correa-Benítez, A.; Hamiduzzaman, M.M.; Guzman-Novoa, E. *Nosema ceranae* Is an Old Resident of Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies in Mexico, Causing Infection Levels of One Million Spores per Bee or Higher during Summer and Fall. *J. Invertebr. Pathol.* **2016**, *141*, 38–40. [CrossRef]
38. Wang, Q.; Dai, P.; Guzman-Novoa, E.; Wu, Y.; Hou, C.; Diao, Q. *Nosema ceranae*, the Most Common Microsporidium Infecting *Apis mellifera* in the Main Beekeeping Regions of China since at Least 2005. *J. Apic. Res.* **2019**, *58*, 562–566. [CrossRef]
39. Dussaubat, C.; Brunet, J.L.; Higes, M.; Colbourne, J.K.; Lopez, J.; Choi, J.H.; Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Cousin, M.; McDonnell, C.; et al. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37017. [CrossRef]
40. Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Sagastume, S.; Juarranz, Á.; Dias-Almeida, J.; Budge, G.E.; Meana, A.; Boonham, N. Microsporidia Infection Impacts the Host Cell's Cycle and Reduces Host Cell Apoptosis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170183. [CrossRef]
41. Mayack, C.; Naug, D. Energetic Stress in the Honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* Infection. *J. Invertebr. Pathol.* **2009**, *100*, 185–188. [CrossRef] [PubMed]
42. Antúnez, K.; Martín-Hernández, R.; Prieto, L.; Meana, A.; Zunino, P.; Higes, M. Immune Suppression in the Honey Bee (*Apis mellifera*) Following Infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 2284–2290. [CrossRef] [PubMed]
43. Schwarz, R.S.; Evans, J.D. Single and Mixed-Species Trypanosome and Microsporidia Infections Elicit Distinct, Ephemeral Cellular and Humoral Immune Responses in Honey Bees. *Dev. Comp. Immunol.* **2013**, *40*, 300–310. [CrossRef] [PubMed]
44. Gage, S.L.; Kramer, C.; Calle, S.; Carroll, M.; Heien, M.; DeGrandi-Hoffman, G. *Nosema ceranae* Parasitism Impacts Olfactory Learning and Memory and Neurochemistry in Honey Bees (*Apis mellifera*). *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb161489. [CrossRef] [PubMed]
45. Ares, A.M.; Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Martín-Hernández, R.; Higes, M.; Bernal, J. Liquid Chromatography Coupled to Ion Trap-Tandem Mass Spectrometry to Evaluate Juvenile Hormone III Levels in Bee Hemolymph from *Nosema* spp. Infected Colonies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2012**, *899*, 146–153. [CrossRef] [PubMed]
46. Wolf, S.; McMahon, D.P.; Lim, K.S.; Pull, C.D.; Clark, S.J.; Paxton, R.J.; Osborne, J.L. So near and yet so Far: Harmonic Radar Reveals Reduced Homing Ability of *Nosema* Infected Honeybees. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103989. [CrossRef] [PubMed]
47. Botías, C.; Martín-Hernández, R.; Barrios, L.; Meana, A.; Higes, M. *Nosema* spp. Infection and Its Negative Effects on Honey Bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the Colony Level. *Vet. Res.* **2013**, *44*, 25. [CrossRef] [PubMed]
48. Benvau, L.R.; Nieh, J.C. Larval Honey Bees Infected with *Nosema ceranae* Have Increased Vitellogenin Titers as Young Adults. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14144. [CrossRef]
49. Urbietta-Magro, A.; Higes, M.; Meana, A.; Gómez-Moracho, T.; Rodríguez-García, C.; Barrios, L.; Martín-Hernández, R. The Levels of Natural *Nosema* Spp. Infection in *Apis mellifera iberiensis* Brood Stages. *Int. J. Parasitol.* **2019**, *49*, 657–667. [CrossRef]
50. Jabal-Uriel, C.; Albarracín, V.N.; Calatayud, J.; Higes, M.; Martín-Hernández, R. Age and Season Effect the Timing of a Adult Worker Honeybee Infection by *Nosema ceranae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *11*, 1–12. [CrossRef]
51. Smart, M.D.; Sheppard, W.S. *Nosema ceranae* in Age Cohorts of the Western Honey Bee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *109*, 148–151. [CrossRef]
52. Jack, C.J.; Lucas, H.M.; Webster, T.C.; Sagili, R.R. Colony Level Prevalence and Intensity of *Nosema ceranae* in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163522. [CrossRef] [PubMed]
53. Chaimanee, V.; Chantawannakul, P.; Chen, Y.; Evans, J.D.; Pettis, J.S. Effects of Host Age on Susceptibility to Infection and Immune Gene Expression in Honey Bee Queens (*Apis mellifera*) Inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **2014**, *45*, 451–463. [CrossRef]
54. Urbietta-Magro, A.; Higes, M.; Meana, A.; Barrios, L.; Martín-Hernández, R. Age and Method of Inoculation Influence the Infection of Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) by *Nosema ceranae*. *Insects* **2019**, *10*, 417. [CrossRef] [PubMed]
55. Huang, S.K.; Ye, K.T.; Huang, W.F.; Ying, B.H.; Su, X.; Lin, L.H.; Li, J.H.; Chen, Y.P.; Li, J.L.; Bao, X.L.; et al. Influence of Feeding Type and *Nosema ceranae* Infection on the Gut Microbiota of *Apis cerana* Workers. *mSystems* **2018**, *3*, e00177-18. [CrossRef] [PubMed]
56. Rubanov, A.; Russell, K.A.; Rothman, J.A.; Nieh, J.C.; McFrederick, Q.S. Intensity of *Nosema ceranae* Infection Is Associated with Specific Honey Bee Gut Bacteria and Weakly Associated with Gut Microbiome Structure. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3820. [CrossRef]
57. Zhang, Y.; Lu, X.; Huang, S.; Zhang, L.; Su, S.; Huang, W.F. *Nosema ceranae* Infection Enhances *Bifidobacterium* spp. Abundances in the Honey Bee Hindgut. *Apidologie* **2019**, *50*, 353–362. [CrossRef]
58. Paris, L.; Peghaire, E.; Moné, A.; Diogon, M.; Debroas, D.; Delbac, F.; El Alaoui, H. Honeybee Gut Microbiota Dysbiosis in Pesticide/Parasite Co-Exposures Is Mainly Induced by *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* **2020**, *172*, 107348. [CrossRef] [PubMed]

59. Taupin, V.; Méténier, G.; Vivarès, C.P.; Prensier, G. An Improved Procedure for Percoll Gradient Separation of Sporogonial Stages in *Encephalitozoon Cuniculi* (Microsporidia). *Parasitol. Res.* **2006**, *99*, 708–714. [CrossRef]
60. Martín-Hernández, R.; Botías, C.; Bailón, E.G.; Martínez-Salvador, A.; Prieto, L.; Meana, A.; Higes, M. Microsporidia Infecting *Apis mellifera*: Coexistence or Competition. Is *Nosema ceranae* Replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 2127–2138. [CrossRef]
61. Smith, E.A.; Newton, I.L.G. Genomic Signatures of Honey Bee Association in an Acetic Acid Symbiont. *Genome Biol. Evol.* **2020**, *12*, 1882–1894. [CrossRef]
62. Castelli, L.; Branchiccela, B.; Garrido, M.; Invernizzi, C.; Porrini, M.; Romero, H.; Santos, E.; Zunino, P.; Antúnez, K. Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microb. Ecol.* **2020**, *80*, 908–919. [CrossRef]
63. Zhang, Y.; Su, M.; Wang, L.; Huang, S.; Su, S.; Huang, W.-F. *Vairimorpha (Nosema) ceranae* Infection Alters Honey Bee Microbiota Composition and Sustains the Survival of Adult Honey Bees. *Biology* **2021**, *10*, 905. [CrossRef]
64. Rouzé, R.; Moné, A.; Delbac, F.; Belzunces, L.; Blot, N. The Honeybee Gut Microbiota Is Altered after Chronic Exposure to Different Families of Insecticides and Infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ.* **2019**, *34*, 226–233. [CrossRef]
65. Li, J.H.; Evans, J.D.; Li, W.F.; Zhao, Y.Z.; DeGrandi-Hoffman, G.; Huang, S.K.; Li, Z.G.; Hamilton, M.; Chen, Y.P. New Evidence Showing That the Destruction of Gut Bacteria by Antibiotic Treatment Could Increase the Honey Bee's Vulnerability to *Nosema* Infection. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187505. [CrossRef]
66. Panjad, P.; Yongsawas, R.; Sinpoo, C.; Pakwan, C.; Subta, P.; Krongdang, S.; In-On, A.; Chomdej, S.; Chantawannakul, P.; Disayathanoowat, T. Impact of *Nosema* Disease and American Foulbrood on Gut Bacterial Communities of Honeybees *Apis mellifera*. *Insects* **2021**, *12*, 525. [CrossRef]
67. Naree, S.; Ellis, J.D.; Benbow, M.E.; Suwannapong, G. Experimental *Nosema ceranae* Infection Is Associated with Microbiome Changes in the Midguts of Four Species of *Apis* (Honey Bees). *J. Apic. Res.* **2022**, *61*, 435–447. [CrossRef]
68. de Oliveira, A.H.; Souza, A.M.D.C.; de Resende, M.T.C.S.; Carneiro, L.S.; de Oliveira, J.E.; Serra, R.S.; Serrão, J.E. The Peritrophic Matrix Delays *Nosema ceranae* Infection in the Honey Bee *Apis mellifera* Midgut. *Physiol. Entomol.* **2023**, *48*, 61–67. [CrossRef]
69. Horton, M.A.; Oliver, R.; Newton, I.L. No Apparent Correlation between Honey Bee Forager Gut Microbiota and Honey Production. *PeerJ* **2015**, *2015*, e1329. [CrossRef] [PubMed]
70. Raymann, K.; Moran, N.A. The Role of the Gut Microbiome in Health and Disease of Adult Honey Bee Workers. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2018**, *26*, 97–104. [CrossRef]
71. Kakumanu, M.L.; Reeves, A.M.; Anderson, T.D.; Rodrigues, R.R.; Williams, M.A. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1255. [CrossRef]
72. Higes, M.; García-Palencia, P.; Martín-Hernández, R.; Meana, A. Experimental Infection of *Apis mellifera* Honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, *94*, 211–217. [CrossRef]
73. Crailsheim, K. Regulation of Food Passage in the Intestine of the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* **1988**, *34*, 85–90. [CrossRef]
74. Crailsheim, K. The Protein Balance of the Honey Bee Worker. *Apidologie* **1990**, *21*, 417–429. [CrossRef]
75. Gillott, C. *Entomology*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1995; ISBN 978-0-306-44967-3.
76. Terra, W.R.; Ferreira, C.; Baker, J.E. Compartmentalization of Digestion. In *Biology of the Insect Midgut*; Lehane, M.J., Billingsley, P.F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1996; ISBN 978-94-010-7179-6.
77. Lee, F.J.; Miller, K.L.; McKinlay, J.B.; Newton, I.L.G. Differential Carbohydrate Utilization and Organic Acid Production by Honey Bee Symbionts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, fty113. [CrossRef] [PubMed]
78. Callegari, M.; Crotti, E.; Fusi, M.; Marasco, R.; Gonella, E.; De Noni, L.; Romano, D.; Borin, S.; Tsiamis, G.; Cherif, A.; et al. Compartmentalization of Bacterial and Fungal Microbiomes in the Gut of Adult Honeybees. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2021**, *7*, 42. [CrossRef]
79. Vidau, C.; Panek, J.; Texier, C.; Biron, D.G.; Belzunces, L.P.; Le Gall, M.; Broussard, C.; Delbac, F.; El Alaoui, H. Differential Proteomic Analysis of Midguts from *Nosema ceranae*-Infected Honeybees Reveals Manipulation of Key Host Functions. *J. Invertebr. Pathol.* **2014**, *121*, 89–96. [CrossRef] [PubMed]
80. Paris, L.; Roussel, M.; Pereira, B.; Delbac, F.; Diogon, M. Disruption of Oxidative Balance in the Gut of the Western Honeybee *Apis mellifera* Exposed to the Intracellular Parasite *Nosema ceranae* and to the Insecticide Fipronil. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 1702–1717. [CrossRef] [PubMed]
81. Aufaure, J.; Misme-Aucouturier, B.; Viguès, B.; Texier, C.; Delbac, F.; Blot, N. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91686. [CrossRef]
82. Tan, S.Q.; Zhang, K.Q.; Chen, H.X.; Ge, Y.; Ji, R.; Shi, W.P. The Mechanism for Microsporidian Parasite Suppression of the Hindgut Bacteria of the Migratory Locust *Locusta migratoria manilensis*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17365. [CrossRef]
83. Zheng, H.; Nishida, A.; Kwong, W.K.; Koch, H.; Engel, P.; Steele, M.I.; Moran, N.A. Metabolism of Toxic Sugars by Strains of the Bee Gut Symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio* **2016**, *7*, e01326-16. [CrossRef]
84. Alberoni, D.; Di Gioia, D.; Baffoni, L. Alterations in the Microbiota of Caged Honeybees in the Presence of *Nosema ceranae* Infection and Related Changes in Functionality. *Microb. Ecol.* **2022**, *86*, 601–616. [CrossRef] [PubMed]

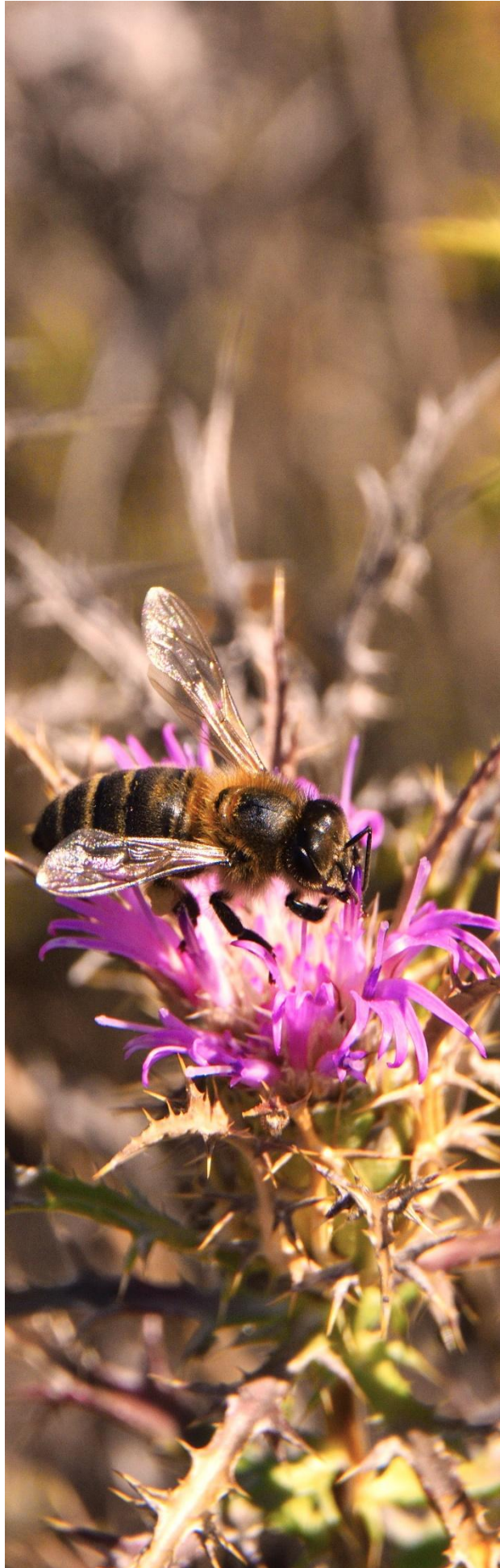
85. Hubert, J.; Bicianova, M.; Ledvinka, O.; Kamler, M.; Lester, P.J.; Nesvorna, M.; Kopecky, J.; Erban, T. Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 685–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Jabal-Uriel, C.; Alba, C.; Higes, M.; Rodríguez, J.M.; Martín-Hernández, R. Effect of *Nosema ceranae* Infection and Season on the Gut Bacteriome Composition of the European Honeybee (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 9326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Anderson, K.E.; Maes, P. Social Microbiota and Social Gland Gene Expression of Worker Honey Bees by Age and Climate. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 10690. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



## **ANEXO II**

**Participación en congresos**





**I Jornada de Investigación en Patología Apícola - Marchamalo, España, 2019**

Comunicación oral: “*Rickettsiales* como agentes de control biológico”. Autores: Daniel Aguado-López.

**VII Jornada VETINDOC 5º PhDay Complutense - Madrid, España, 2021**

Póster: “La edad de infección experimental con *Nosema ceranae* influye en la microbiota intestinal de *Apis mellifera*”. Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbieto Magro, Mariano Higes Pascual, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Raquel Martín-Hernández.

**10º Congreso Nacional de Apicultura - Online, 2022**

Póster: “Modulación de la microbiota intestinal de las abejas infectadas experimentalmente con *Nosema ceranae*”. Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbieto Magro, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

**XLI Feria Apícola Internacional de Pastrana - Pastrana, España, 2022**

Comunicación oral: “Tripanosomátidos en Azores, el paraíso sin varroa”. Autores: Daniel Aguado-López, Xulio Maside, Carolina Bartolomé Husson, Alice Pinto, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

**9th Eurbee European Congress of Apidology - Belgrado, Serbia, 2022**

Póster: “Trypanosomatids in the Azores”. Autores: Daniel Aguado-López, Xulio Maside, Carolina Bartolomé Husson, Alice Pinto, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

Póster: “Comparison of different DNA extraction methods for the study of pathogens and intestinal bacteria in honeybees”. Autores: Daniel Aguado-

López, María Buendía-Abad, Clara Jabal-Uriel, María Benito-Murcia, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

Póster: “Honeybee gut microbiota modulation in experimentally infected workers with *Nosema ceranae*”. Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbietta Magro, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

Póster: “Determination of the chronic median lethal doses (LD50) of two common synthetic acaricides in *Apis mellifera*”. Autores: María Benito-Murcia, Elena Alosó Prados, Cristina Botías, Raquel Martín-Hernández, Daniel Aguado-López, Clara Jabal-Uriel, Mariano Higes.

Póster: “Biomarkers determination in adult bees exposed to lethal doses of two acaricides taking an in vivo and in vitro approach”. Autores: María Benito-Murcia, Cristina Botías, Raquel Martín-Hernández, Daniel Aguado-López, Clara Jabal-Uriel, Mariano Higes, Salomé Martínez Morcillo.

## **II Jornada de Investigación en Patología Apícola - Marchamalo, España, 2022**

Comunicación oral: “Modulación de la microbiota intestinal de las abejas infectadas experimentalmente con *Nosema ceranae*”. Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbietta Magro, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

## **International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control & 55th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology - Maryland, Estados Unidos, 2023**

Comunicación oral: “Biotic and abiotic factors interacting with *Nosema ceranae* infection in honeybees”. Autores: Daniel Aguado-López, Clara Jabal-Uriel, Soledad Sagastume, Almudena Urbietta Magro, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández

### **XLII Feria Apícola Internacional de Pastrana - Pastrana, España, 2023**

Comunicación oral: “Modulación de la microbiota intestinal de las abejas infectadas con *Nosema ceranae*” Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbietta Magro, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández.

### **48th Apimondia International Apicultural Congress - Santiago de Chile, Chile, 2023**

Comunicación oral: “Frequent parasitism of *Apis mellifera* by trypanosomatids in geographically isolated areas with restricted beekeeping movements”. Autores: Raquel Martín-Hernández, Daniel Aguado-López, Carolina Bartolomé, Ana Rita Lopes, Dora Henriques, Xulio Maside, Alice Pinto, Mariano Higes.

Póster: “Factors affecting honey bee colonies (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) in agricultural areas: presence of pathogens and food's nutritional quality”. Autores: Amelia Virginia González-Porto, Daniel Aguado-López, Soledad Sagastume de Andrés, Nauzet Dorta García, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

Póster: “Honeybee gut microbiota modulation in experimentally infected workers with *Nosema ceranae*”. Autores: Daniel Aguado-López, Almudena Urbietta Magro, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

### **Jornada Abejas y Plaguicidas – Marchamalo, España, 2024**

Comunicación oral: “Microbiota intestinal y salud de las abejas” Autores: Daniel Aguado-López.

**Bee Health Symposium - Madrid, España, 2024**

Póster: “Frequent Parasitism of *Apis mellifera* by Trypanosomatids in Geographically Isolated Areas with Restricted Beekeeping Movements”  
Autores: Daniel Aguado-López, Carolina Bartolomé, Ana Rita Lopes, Dora Henriques, Xulio Maside, Alice Pinto, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

**10th Eurbee European Congress of Apidology - Tallin, Estonia, 2024**

Póster: “*Varroa destructor* and *Nosema ceranae* shape the honey bee gut microbiota” Autores: Daniel Aguado-López, Alice Pinto, Ana Rita Lopes, Dora Henriques, Juan Miguel Rodríguez Gómez, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

**III Jornada de Investigación en Patología Apícola - Marchamalo, España, 2024**

Comunicación oral: “Microbiota y salud apícola”. Autores: Daniel Aguado-López.

# AGRADECIMIENTOS



## Agradecimientos

“Es peligroso, Frodo, cruzar tu puerta. Pones los pies en el camino, y si no cuidas tus pasos, nunca sabes a dónde te pueden llegar” – Bilbo Bolsón.

Así como Bilbo o Frodo un día decidieron dar el primer paso para emprender una aventura, en el año 2019 comenzó la mía en este viaje que ha sido la tesis doctoral. No sabía entonces los desafíos que me esperaban, ni los momentos de duda que surgirían en el camino, pero, al igual que ellos, en ningún momento estuve solo. Este logro no es solo mío, sino de todos aquellos que han sido mi Comunidad del Anillo, mis guías y mi refugio en los días más oscuros.

Me gustaría empezar agradeciendo a mis directores de tesis, Raquel Martín Hernández y el Mariano Higes Pascual. Gracias a vuestra guía, he podido enfrentar los retos más grandes y seguir avanzando, incluso cuando el destino parecía inalcanzable.

Raquel, muchísimas gracias por confiar en mí y por toda la paciencia que has tenido conmigo. Por todo el cariño que me has aportado en estos años y por la positividad que me has transmitido en muchas ocasiones cuando yo lo veía negro, aunque en alguna ocasión esa positividad contagiosa nos ha hecho darnos algún pequeño susto. Por todos los ánimos que me has dado, por ponerme los pies en la tierra cuando se me pasaba por la cabeza alguna teoría o propuesta descabellada y razonándome con gran criterio científico por qué no podía ser. Por nuestras disertaciones que nos han hecho irnos por las ramas y terminarlas al cabo de un rato con un “bueno, que nos vamos de lo importante”. Por las horas de pensamiento, escritura y correcciones, que no ha sido pocas. Por tu búsqueda soluciones para que todo saliera perfecto, por tus consejos y por tus comentarios que siempre me han hecho ver con otra perspectiva la situación. Por transmitirme todos tus conocimientos en apicultura y biología molecular y que tanto han hecho para que esta tesis fuera posible. Por los viajes que hemos podido compartir juntos y por lo agradable y alegre que ha sido y es siempre tu compañía. Infinitas gracias por todo.

Mariano, quiero agradecerte todo el apoyo que me has dado a lo largo de estos años. Gracias por tu paciencia y dedicación, por enseñarme desde los aspectos básicos de la apicultura hasta guiarme en el análisis estadístico de los datos para que los resultados tengan consistencia y robustez estadística y sacar las conclusiones acertadas. Por tu criterio científico y estar siempre dispuesto

a compartir tu conocimiento y experiencia, y transmitir tu pasión por la investigación. Por esas preguntas que siempre hacen pensar y que generan curiosidad por seguir investigando. Por tu ánimo constante para seguir adelante y tus “ya no queda nada”. Por tu amabilidad, tu tranquilidad y tu comprensión en los momentos de más agobio. Millones de gracias.

Me gustaría darle las gracias también a mi tutor en la Universidad Complutense de Madrid, Juan Miguel Rodríguez. Por tu consejo científico cuando lo hemos necesitado para abordar de forma adecuada el estudio que queríamos llevar a cabo. Por tu entera disponibilidad para preguntarte dudas o para echar un vistazo a los trabajos para conocer tu opinión y por aportar tus sugerencias. Por transmitir con pasión tus conocimientos sobre los microorganismos, porque cada charla se convierte en una *masterclass* sobre microbiota. Muchísimas gracias.

Quiero dar las gracias al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por concederme la ayuda predoctoral para poder realizar la tesis. A todo el personal del IRIAF y especialmente a Conrado, del Servicio de Investigación Agraria, por su labor administrativa en lo referente a la gestión de los contratos predoctorales. A los informáticos, por su disposición inmediata cuando había algún problema o necesitaba algún programa para trabajar con los datos obtenidos. También quiero agradecer al personal de la Facultad de Veterinaria de la UCM. A Manuela, por tu buen hacer como coordinadora del Programa de Doctorado en Veterinaria y por solucionar todas las dudas sobre todos los plazos y trámites. A Estefanía, por su A todas las personas con las que he coincidido en el Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos y que me acogieron siempre que estuve allí. Rebeca, por todo lo que me has enseñado sobre microbiología y por estar siempre dispuesta a ayudarme con una sonrisa. Claudio, por tu paciencia, por tus enseñanzas sobre todo en lo relacionado con el análisis de datos metataxonómicos, por tu consejo y apoyo.

También quiero agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo en mi estancia en el Grupo de Medicina Xenómica del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela. A Xulio Maside y Carolina Bartolomé gracias por invitarme a realizar la estancia con vosotros y por enseñarme tanto de genética

de poblaciones en tan poco tiempo. Aún me acuerdo en ocasiones de ese agobio que teníamos cuando pasaban los días y las secuencias no llegaban, pero al final todo acabó saliendo a la perfección. A Damián por estar conmigo desde el primer minuto hasta el último, por tu amabilidad en todo momento, incluso cuando la trípex dejó explotó por los aires (aún recuerdo tu cara), por todos los buenos ratos en el laboratorio y fuera de él. Por que como te dije en su momento, fui allí solo y me volví con un amigo. A Alex, Leandro, Johan, Sara, Aroa y Jorge, por ese fin de semana estupendo en la sierra de Ancares. Gracias a todos por haberme acogido de esa forma tan cálida y hacerme sentir como uno más.

Quiero agradecer a tres profesores que he tenido a lo largo de mi vida y que, en parte, han sido responsables de que hoy esté aquí. A Ana María Delgado, mi profesora de Ciencias Naturales en la ESO, por despertar en mí el interés por los seres vivos y por sembrar esa primera semilla que sigue floreciendo. A Miguel de Luis, mi profesor de Ciencias del Mundo Contemporáneo y Geología en bachillerato, por transmitirme tu pasión por la Biología y animarme a estudiar esta maravillosa ciencia. Me dijiste que si lo acababa haciendo, no me iba a arrepentir (estabas en lo cierto). A María Enriqueta Arias, mi profesora de Biotecnología Microbiana en la universidad de Alcalá, por ser esa chispa que encendió de mi pasión por la Microbiología.

A todo el personal del CIAPA y aquellas personas que han pasado por allí durante todos estos años. José Alberto Viñuelas, por tu labor como director del Centro, por tus ánimos, por tu buen humor, por tus “honorables becarios” cada vez que nos cruzamos, por poner el himno del atleti cuando gana. Al equipo de Secretaría actual, Cristina y Enrique, y a todos los que han pasado por ese despacho, Isabel, Rebeca, Luis, Carmen, Bea, Raúl, gracias por vuestra ayuda constante. A Ana y Fernando de Tecnología Apícola y Formación. A los compañeros del Laboratorio de Mieles. Meli, por tu sonrisa permanente y por tus ánimos. A María, Vanessa, Inma, Raquel y Juanjo (se te echa de menos). Por nuestros debates durante los desayunos y por poner a prueba mi fuerza de voluntad con los dulces. A Antoñito, por tu alegría y por tocarme las narices (siempre desde el cariño) llamándome “herbario”. A Antonio López, Carlos García y a todos los compañeros “de azul” de Experimentación Agraria. A Nico, por ser tan amable y dispuesto siempre. A Anne, que desde que llegaste nos has encandilado a todos con tu alegría, tu actitud y tu

predisposición. Por tener siempre una sonrisa en la cara. Por tu consejo y por confiar en mí para darte yo el mío. Gracias.

A mis predecesoras: Almudena Urbietta, Cristina Botías, Soledad Sagastume y Tamara Gómez. Almudena, te tomé el relevo y cuando entré tú defendías la tesis, pero gracias a tu ensayo de la edad de infección pude llevar a cabo el estudio que ha formado parte de esta tesis. Cristina, eres posiblemente de las personas más capaces que conozco. Siempre dispuesta a ayudar y mostrando interés por mis trabajos. Por tu cariño y apoyo. A Sole, por tu sonrisa constante, por tu alegría y tu buen humor. Por tu apoyo en esta última fase de la tesis y por ofrecerme “un espinito” para poder relajarme (aunque he conseguido sobrevivir sin él). Tamara, porque tu trabajo en el CIAPA inició la línea de investigación en tripanosomátidos que tanto trabajo ha dado en todos estos años. Gracias por tu amabilidad y tu apoyo cuando hemos coincidido.

A los compañeros del Laboratorio de Patología Apícola. Javi, Jesús y David. Javi, aunque solo pudimos coincidir en mis dos primeros años, me hiciste ver lo grandísima persona que eres. Tenemos pendiente el “*I want to break free*”, no se me olvida. Jesús, por tu tranquilidad y tus ánimos todos estos años. A ver cuando nos dices tu secreto para encontrar las reinas con tan solo un vistazo al cuadro. David, llegaste prácticamente a la vez que yo y desde el primer momento mostraste una adaptación que te hizo ser imprescindible en estos últimos años. Por todas las charlas y momentos en el campo. Gracias a los tres por enseñarme todo lo que se de manejo de colmenas y por vuestra ayuda cuando ha sido necesario salir al campo. Por vuestra enorme labor en la gestión de las colmenas del CIAPA de Marchamalo.

A mis chicas. Virgi, por darme siempre consejo, por tu sonrisa y por tu alegría. Por echarme una mano con los pedidos y por tu ayuda cuando lo he necesitado. Por tus abrazos cuando me has visto agobiado y por celebrar conmigo en mis éxitos. Gracias de verdad. A Tere, por estar siempre dispuesta a solucionar cualquier problema y a ayudar cuando más se necesita. Gracias por todos los consejos, tu apoyo, tus “ya verás como todo sale bien” que tanto tranquilizan y por tu buen humor. A Carmen, gracias por tu paciencia y tu tranquilidad contagiosa, por preocuparte tanto por mí en mis malos momentos. María, por tu complicidad, tu alegría y por ayudarme cuando lo he

necesitado (sobre todo cuando me empecé a hinchar como un globo cuando me picó una abeja). A las cuatro, gracias de corazón, porque todo el mundo debería tener la suerte de tener compañeras como vosotras.

A mis “*Apes*”, los mejores compañeros de despacho que uno podría desear. Beni, no te imaginas lo que te he echado de menos desde que terminaste. Gracias por tu apoyo y por tus ánimos cuando las cosas no me salían. Por tus citas famosas, por esa sonrisa contagiosa y por todas nuestras charlas sobre realfooding y deporte. Clarita, parece que fue ayer cuando íbamos para la complu y cada día lo hacíamos por un camino distinto. Por subirme los ánimos y echarme un cable en estos últimos meses. Por todas nuestras conversaciones y debates y todos los buenos momentos en el laboratorio, en el despacho y en el campo. Fer y Toño, Toño y Fer, habéis sido los últimos en llegar, pero habéis entrado como un elefante en una cacharrería. Fer, por ese humor tan tuyo que siempre consigue que me acabe riendo, por nuestro saludo secreto y por confiar en mí para pedirme consejo. Toño, mi padawan, gracias por preocuparte constantemente por mí y por sacarme una sonrisa con tu llanto agudo característico. Por tu giro de cuello que en algún momento acabará haciendo crac y que con una mirada es suficiente para saber lo que nos pasa por la cabeza. Ahora os toca a vosotros dos tomar el relevo, sé que lo vais a hacer genial y tened la certeza de que estaré ahí para ver como lo conseguís. María, sin ti no estaría donde estoy hoy. Por ser una de las personas más importantes en mi vida y por estar siempre, en las buenas y en las no tan buenas. Porque aunque la vida nos separe siempre nos vuelve a juntar de alguna manera. Gracias por cada risa, cada consejo y por tu apoyo incondicional. Gracias por confiar siempre en mí, pequeña hobbit. A todos vosotros, por el consejo de sabios y por siempre estar dispuestos a ayudarnos cuando alguno lo necesita. ¡¡*Apes together strong!*!!

A mi familia de Cabanillas, los de siempre, los que han estado apoyándome durante todo este trayecto. Miguelito, mi hermano, nos conocimos en preescolar y aquí estamos, 30 años después (y los que nos quedan). Gracias por tu confianza y por tus ánimos constantes, por estar siempre y ser un verdadero amigo. A mis “*Archis*”: Thomas, Carlota, María, Cabra, Henar, Ale, Teresa, Sammy, Budi. Gracias por ser la familia que se escoge, por vuestro cariño y por apoyarme siempre, incluso cuando he estado más desaparecido.

A mi familia de la UAH. Ernesto, hermano, gracias por ser un pilar fundamental en mi vida y por sacarme una carcajada hasta en el peor de los momentos. Gracias por tu apoyo constante, me siento muy afortunado de tener a alguien como tú a mi lado. Por seguir celebrando cosas juntos. Marta, gracias por compartir este viaje y estar desde el principio. A todos los demás que formaron parte de la experiencia universitaria en Alcalá, también quiero darles las gracias porque dejaron un pedacito de ellos en mí.

A mi familia de la UBU. Miguel y Juankar, porque a pesar de la distancia siempre estáis. Por nuestras confianzas en el “puntito” y por todos nuestros viajes y momentos. A toda aquella clase de todopoderosos con la que conquistamos Burgos. Gracias por aportar vuestro granito de arena.

A la gente de Serradilla del Arroyo, por su acogida desde el primer día y por su apoyo y ánimos constantes. Porque cada primera quincena de agosto es un soplo de aire fresco.

A Sandra, mi compañera de vida. Por ser mi alegría de cada día. Por tu amor infinito y tu cariño incondicional. Por cuidarme como lo haces. Por ser mi sustento en los días malos. Por ser mi refugio. Por darme luz en la oscuridad. Por sacarme una sonrisa todos los días. Por tener la paciencia infinita que tienes conmigo. Porque tenerte en mi vida es una de las cosas más bonitas que me ha podido pasar. Te quiero.

A la familia Díaz Barrios, por acogerme desde el primer momento y por preocuparos tanto por mí. Por hacerme sentir como en casa cuando estoy con vosotros. Millones de gracias.

Y, por último y más importante, quiero agradecer a mi familia. A mis primos y primas, Sandra, Lydia, Iván, Laura y la pequeña África. A mis tíos, Ana y Ramón, Jose y Antonio, Mayte y Julio, y Raquel y Fernan. A mi tía Sonia. Gracias por vuestro amor y cariño.

A mis padres, Ángel y Carmen. Soy la persona más afortunada del mundo por tener unos padres como vosotros. Por la educación y los valores que me habéis enseñado. Por estar siempre dispuestos a ayudarme haciendo que mi vida sea más sencilla. Por apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Por vuestra humildad, vuestro amor y vuestro sacrificio para que nunca me haya faltado nada. Sois el mayor de mis referentes y si en algún

momento la vida decide que debo ser padre, espero ser al menos la mitad de buen padre de lo que sois vosotros para mí. Os quiero con todo mi corazón. A mi hermano, Mario, porque aunque hayamos tenido nuestros altibajos, nunca me has fallado. Me siento orgulloso de tener un hermano tan leal y fiel como tú. Porque, aunque no lo supieras, aquellas noches jugando a la play, viendo pelis o comiendo pizza me ayudaban a evadirme completamente de todo lo demás y solo estábamos tú y yo. Por nuestros piques infinitos. Gracias por estar siempre ahí. Te quiero.

A mis abuelos Ana, Pepe, Mari y Ángel. Por cuidar de mí y mostrarme el verdadero amor incondicional. La persona que soy hoy en día es en gran parte gracias a vosotros. Os quiero muchísimo. A mi abuela Ana, aunque ya no estés con nosotros te tengo siempre conmigo. Gracias por haberme dado todo el amor que un persona puede dar. Por esa alegría que desprendías cada vez que me veías con tus “¡Ay mi Dani!”, por tu bondad, tu cariño y humildad. Porque el mundo necesita más personas como tú. Por hacerme sentir especial. Te echo mucho de menos y espero que desde allí donde me estés viendo, estés orgullosa de mí. Te quiere “tu Dani”.

Gracias a todos y a todas, no solo por haber formado parte de esta tremenda aventura, sino porque todos y cada uno de vosotros formáis parte de mí.

“A más ver, mis valientes hobbits. Mi labor ha concluido. Aquí, al fin, a la orilla del mar, llega el adiós a nuestra Compañía. No diré «no lloréis», pues no todas las lágrimas son amargas.” – Gandalf.

## Agradecimientos







