Thomas E Ibáñez Battiston, M Agustina Rodríguez y Leticia A Fernández

Laboratorio de Estudios Apícolas—Centro Asociado CIC, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS)

Probióticos y abejas: aliados en la apicultura

¿Qué es un probiótico?

La Organización para la Agricultura y la Ganadería (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como 'microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios en la salud del hospedador'. Existe una serie de criterios mínimos que el microorganismo debe cumplir para ser considerado como un probiótico. Los criterios, propuestos por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, 2018) incluyen: 1) el probiótico debe ser caracterizado de manera tal que pueda ser identificado a nivel de género, es-

pecie y cepa; 2) debe ser nombrado de acuerdo con la nomenclatura científica válida; 3) debe ser un microorganismo seguro para la salud y el ambiente, conocido con las siglas GRAS (del inglés Generally Recognized As Safe); 4) la cepa probiótica debe ser depositada en una colección de cultivos internacional; 5) el probiótico debe presentar un beneficio para la salud demostrado en al menos un estudio con humanos, y 6) los productos que utilicen probióticos deben proporcionar hasta el final de su vida útil un nivel suficiente de microorganismos vivos de manera tal que confieran un beneficio para la salud.

Para comenzar, se debe obtener un cultivo puro. Con esto nos referimos a una población de microorganis-

¿DE QUÉ SE TRATA? -

Son conocidos los beneficios de incorporar probióticos en nuestra dieta diaria. De la misma forma estos beneficios alcanzan a distintos animales, entre ellos a las abejas. Microorganismos aislados del kéfir son propuestos como probióticos para abejas.

mos crecidos a partir de una colonia en placas de Petri, sobre un medio de cultivo apropiado al que se le agrega agar-agar para solidificarlo (ver 'Propóleos: su uso como biofungicida agrícola', Ciencia Hoy, 26 (155): 59). De dichos cultivos puros se procede a realizar una serie de pruebas que ponen en evidencia las distintas características del microorganismo.

Las pruebas más comúnmente realizadas para que un microorganismo sea considerado como un probiótico para humanos son las siguientes: resistencia al ácido gástrico y al ácido biliar, adherencia al mucus o a células epiteliales humanas, actividad antimicrobiana contra posibles patógenos, habilidad para reducir la adhesión de patógenos a superficies, efecto contra posibles patógenos y actividad hidrolítica sobre sales biliares. Dichas pruebas analizan la habilidad del microorganismo para sobrevivir

bajo condiciones similares a las que se encontraría en el tracto digestivo humano, conviviendo con otros microorganismos naturalmente presentes en la microbiota intestinal. Finalmente, los candidatos no deben tener efectos patogénicos. Para ello se realizan distintos análisis, como por ejemplo la prueba de hidrólisis de sangre, siendo un resultado positivo una característica típica de patógenos.

¿Por qué pensar en probióticos para abejas?

Las abejas se alimentan de néctar y polen, siendo el primero la principal fuente de hidratos de carbono y el segundo, fuente de proteínas y lípidos. Estos insectos sociales, considerados como los polinizadores por excelencia, almacenan reservas de alimento en forma de miel y fabrican otros productos apícolas como polen, propóleos y jalea real. La miel constituye un alimento importante desde el punto de vista nutricional y el ser humano ha aprendido a extraerla de los panales y a trabajar con las abejas desde hace miles de años.

Nuestro país es un gran productor y exportador de miel, posicionándose como el tercero con mayor producción a nivel mundial, después de China y Estados Unidos. A su vez, los datos indican que el 70% de la miel producida en el hemisferio sur del continente americano, el 25% de la producción de todo el continente y el 6% del total producido en el mundo corresponden a la Argentina. De manera que la apicultura constituye una importante actividad productiva, generadora de ingresos y de divisas.



Abeja recolectando polen en sus patas traseras.

Las prácticas intensivas de la agricultura moderna, caracterizadas por el monocultivo, así como la fragmentación del hábitat y la pérdida de zonas agrestes, provocan que las fuentes de recursos para las abejas sean escasas, impidiéndoles una óptima alimentación (ver editorial 'Abejas y cultivos de soja', Ciencia Hoy, 28 (166): 49-53). Puntualmente, el avance del área sembrada que experimentó la Argentina en los últimos años modificó los agroecosistemas, lo cual repercutió directamente sobre la actividad apícola. La reducción de la vegetación espontánea, muchas veces fuente de alimento para las abejas, provocó una merma en la variedad y en la calidad de las fuentes de néctar y polen. Este avance de la agricultura también ha ido acompañado por un aumento en el uso de agroquímicos. Además, dadas las expectativas de buenos precios para la venta de miel, algunos productores cosechan completamente sus colmenas, por lo que deben aplicar sustitutos de alimentos que permitan evitar futuros problemas nutricionales. Este conjunto de factores ha causado escasez en los recursos que necesitan las abejas para tener un estado de salud óptimo. Un panal cuyos integrantes no hayan cumplido con los requerimientos nutricionales adecuados presenta menor cantidad de abejas y menor producción de miel. De igual manera, una población que no logra obtener los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo se ve más propensa al ataque de distintos patógenos.

En este contexto, el uso de probióticos en los suplementos alimentarios que el apicultor utiliza en las colmenas se presenta como una alternativa natural, amigable con el medio ambiente, fácil de aplicar y que no deja residuos contaminantes en la colmena ni tampoco en la miel.

Kéfir de agua: bebida fermentada junto a los gránulos que la conforman.

Pruebas *in vitro* para caracterizar a los microorganismos que estudiamos como potenciales probióticos para abejas. **A.** Prueba de carbonato de calcio. **B.** Prueba de fermentación de glucosa.

Probióticos para abejas

Existen múltiples y diversas fuentes naturales de probióticos. Una de ellas es el kéfir, un fermento tradicional y natural caracterizado por gránulos compuestos por una matriz de polisacáridos y proteínas que contienen en su interior un complejo sistema microbiológico en el cual se encuentran en asociación simbiótica bacterias lácticas y levaduras responsables de la fermentación.

El kéfir de agua es una bebida que el ser humano consume desde hace miles de años. Se obtiene a partir de la fermentación de una preparación de azúcar y fruta en presencia de estos gránulos. Una vez finalizado el proceso fermentativo, se filtra el preparado y los gránulos son reutilizados. Es así que estas comunidades de microorganismos sufrieron un largo proceso de selección durante el pasaje de preparación en preparación y existen tantos tipos de gránulos como familias que los conservan. Es un alimento funcional, lo que quiere decir que, además de su aporte nutricional, tiene un efecto positivo sobre el estado de salud del consumidor. Para el caso del kéfir de agua, su efecto sobre la salud puede provenir de compuestos bioactivos, productos

del metabolismo de los microorganismos que lo componen y de su naturaleza como producto probiótico.

A partir de preparaciones de kéfir de agua realizadas en el laboratorio, se aislaron y caracterizaron distintas cepas de bacterias y de levaduras. Partiendo de estos cultivos puros, se llevaron a cabo las distintas pruebas necesarias para determinar su potencial a fin de actuar como probiótico. En este caso, las pruebas seleccionadas tienen que ver con la fisiología de la abeja, ya que nuestro probiótico candidato será incorporado en un





Prueba de inhibición de *Ascosphaera apis*. **Izquierda.** Placa de Petri inoculada con cuatro candidatos a probióticos (B1, B2, B10 y B5) que muestran inhibición del hongo patógeno. **Derecha.** Placa de Petri inoculada con cuatro candidatos a probióticos que no presentan actividad antimicrobiana.





Prueba de inhibición *Paenibacillus larvae*. **Izquierda.** Cuatro candidatos a probióticos que inhiben su crecimiento (se observan halos de inhibición). **Derecha.** Placa de Petri con la bacteria patógena.

alimento destinado a mejorar su estado nutricional. Así, contamos con una colección de bacterias y levaduras aisladas a partir de kéfir de agua con potencial probiótico para ser utilizados en alimentación de abejas.

Para ahondar en el estudio de la capacidad de un microorganismo de actuar como probiótico, se hicieron pruebas que tienen que ver con la inhibición de patógenos de la colmena, es decir, que estudiamos su actividad antimicrobiana. Puntualmente, hemos trabajado con Ascosphaera apis, hongo causante de la enfermedad llamada 'cría yesificada', y con Paenibacillus larvae, bacteria causante de la enfermedad conocida como 'loque americana'. Ambos patógenos afectan a las larvas de abejas. Para estudiar la inhibición del hongo, se coloca un disco del micelio del hongo en el centro de la placa de Petri, se realizan cuatro pozos en el agar donde se colocan los cultivos de los potenciales probióticos y se espera observar que el microorganismo seleccionado impida el crecimiento del hongo. En el caso del patógeno bacteriano, primero se siembra P. larvae en toda la placa, luego se hacen los pozos donde se agregan los probióticos a estudiar y se espera observar halos de inhibición transparente alrededor del microorganismo seleccionado como potencial probiótico.

Finalmente, luego de someter la colección de potenciales probióticos a las pruebas in vitro contra estos patógenos larvales de abeja, se seleccionaron los que presen-

taron actividad antimicrobiana, para proceder luego a identificarlos genéticamente. La caracterización permite determinar el género y la especie del microorganismo candidato a probiótico. Esta información se compara con bases de datos, lo cual permite obtener la identidad del microorganismo (ver editorial 'La secuenciación del ADN y sus consecuencias, Ciencia Hoy, 27 (157): 4-5). Así, pudimos conocer la identidad de cada uno: las bacterias fueron identificadas como cepas de Lentilactobacillus hilgardii y Lentilactobacillus buchneri, ambas bacterias lácticas; y las levaduras fueron identificadas como Saccharomyces cerevisiae, la misma que el ser humano utiliza para levar masas y fabricar cerveza.

Los próximos pasos

Las investigaciones realizadas nos permitieron seleccionar microorganismos con potencial probiótico que podrían mejorar la producción apícola. Las próximas etapas requieren experimentos donde larvas de abejas alimentadas o no con los probióticos seleccionados sean expuestas a los patógenos en cuestión. Por el otro, nuestras investigaciones también continuarán en el campo junto a los productores apícolas para probar la funcionalidad de los probióticos seleccionados en el laborato-



rio. Para ello, los microorganismos se combinarán con alimentos artificiales que se encuentran en el mercado como insumo para los productores apícolas y serán aplicados directamente en las colmenas.

Agradecemos la colaboración permanente de Liliana M Gallez (directora del LabEA), Marina L Díaz (CERZOS-Conicet) y Francisco J Reynaldi (CEMIBA-UNLP). Además, es muy importante mencionar que contamos con el apoyo de la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero (www.cooperativapampero.coop).

- LABORATORIO DE ESTUDIOS APÍCOLAS -

El Laboratorio de Estudios Apícolas (www.labea.criba.edu.ar) es un centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (www.cic.gba.gob.ar/centros/laboratorio-de-estudios-apicolas-labea/) que funciona en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (www.uns.edu.ar) en la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. El laboratorio fue creado en 2009 sobre la base del Laboratorio de Calidad de Mieles que existía desde 1994 y hoy se abordan numerosas líneas de investigación en apicultura (www.labea.criba.edu.ar/idioma/es/invDes.html).



9 (3): 239-240.

LECTURAS SUGERIDAS

AUDISIO MC, 2017, 'Microorganismos beneficiosos para la abeja melífera: metabolitos y probióticos', *Campo y Abejas Noticias*, septiembre: 11.

FINA BL, LOMBARTE M y RIGALLI A, 2013, 'Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico?*', *Actualizaciones en Osteología*,

GUTIÉRREZ RAMÍREZ LA, MONTOYA OI V VÉLEZ ZEA JM, 2013,

'Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal', Producción + Limpia, 8: 135-146.

SALAZAR BC y MONTOYA OI, 2003, 'Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana'. *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 10 (2): 20-26.



Thomas E Ibáñez Battiston

Estudiante de grado de Bioquímica, Universidad Nacional del Sur (UNS). Becario del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN). ibanezbattiston@gmail.com



María Agustina Rodríguez

Estudiante de posgrado, doctorado en Agronomía en curso, UNS. Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC). agustina.rodriguez@cyt.cic.gba.gob.ar



Leticia A Fernández

Doctora en biología, LabEA, Departamento de Agronomía, UNS. Investigadora adjunta de Conicet. Ayudante de Docencia, UNS. *lafernan@uns.edu.ar*