

# EFECTO INHIBITORIO DE LEVADURAS *Trichosporon* spp. FRENTE A DIFERENTES CEPAS DE *Ascospaera apis*, PROVENIENTES DE ESPAÑA Y PROVINCIAS ARGENTINAS

## INHIBITORY EFFECT OF *Trichosporon* spp. YEASTS IN THE PRESENCE OF DIFFERENT STRAINS *Ascospaera apis*, FROM SPAIN AND ARGENTINIAN PROVINCES

Ramos A. C.<sup>1</sup>; Tejerina M. R.<sup>1</sup>; Benitez Ahrendts M. R.<sup>1</sup>

### RESUMEN

La cría yesificada es una enfermedad causada por *Ascospaera apis*. Afecta a larvas de abejas melíferas, causando pérdidas económicas en el sur de Argentina y otros países. El objetivo de este trabajo fue evaluar dos cepas de *Trichosporon* spp., frente a *A. apis*. Las levaduras fueron aisladas de intestino de abejas, y de superficie de *Varroa destructor* del apíario Severino (El Carmen) en medio Polen y MEA líquido, para evaluar su crecimiento. Se trabajó con cuatro cepas de *A. apis* provenientes de: Ciudad Real (España), Entre Ríos, Misiones y Jujuy; se realizaron suspensiones celulares de levaduras a concentraciones de  $10^3$  UFC/ml y se sembró 20 $\mu$ l en posillos en placas con Medio Agar-Polen, con explantes del patógeno. Los cultivos se incubaron a 30°C, en microaerofilia por 10 días. Se midieron los diámetros y se registró la presencia de esporulación de las cepas de *A. apis*. Las levaduras registraron un aumento de concentración en Medio Polen y no así en MEA. Además, lograron inhibir el crecimiento de las cepas de *A. apis*, siendo más efectiva la cepa aislada del intestino de abeja. Sin embargo, ambas levaduras podrían ser utilizadas como agentes biocontroladores.

**Palabras claves:** Abejas melíferas. *Ascospaera apis*. Biocontrol. *Trichosporon* spp.

### SUMMARY

Chalkbrood disease is caused by *Ascospaera apis*. It affects honeybee larvae causing economic losses in southern Argentina and other countries. The objective of this study was to evaluate two strains of *Trichosporon* spp., versus *A. apis*. The yeasts were isolated from bees intestine, and from the *Varroa destructor* surface from the Severino apiary (El Carmen) in Pollen Medium and liquid MEA, to evaluate its growth. Four strains of *A. apis* from: Ciudad Real (Spain), Entre Ríos, Misiones and Jujuy were used; yeast cell suspensions were made at concentrations of  $10^3$  CFU / ml and 20 $\mu$ l was sown in dishes on plates with Agar-pollen Medium, with pathogen explants. The cultures were incubated at 30 ° C, in microaerophilia for 10 days. The diameters were measured and the presence of strains sporulation of *A. apis* was recorded. The yeasts recorded an increase in concentration in Pollen Medium and not in MEA. In addition , they were able to inhibit *A. apis* strains growth, being the isolated strain of the bee intestine more effective. However, both yeasts could be used as biocontrol agents.

**Keywords:** *Ascospaera apis*. Biocontrol. Honeybee. *Trichosporon* spp.

## INTRODUCCIÓN

La cría yesificada es una enfermedad de origen fúngico causada por *Ascospaera apis*, que afecta a larvas de abejas melíferas, causando pérdidas económicas en el sur de Argentina y otros países. El hongo invade a su huésped superando su sistema inmune (Albo y Reynaldi, 2010; Aronstein y Murray, 2010; Jensen y col, 2015), reduciendo de manera sustancial la cantidad de abejas y muerte de la colmena. Las larvas ingieren las esporas de *A. apis* junto con el alimento suministrado por las nodrizas (Reynaldi y col, 2003, 2004). Una vez que la espora ha germinado en el intestino, las hifas atraviesan la pared intestinal, y se extienden por todo el cuerpo, apareciendo en la superficie corporal cuando la larva alcanza la fase de pre-pupa. En esta superficie se desarrollan los cuerpos fructíferos, que producirán una nueva generación de esporas (Padilla y col, 2014). Las larvas enfermas están cubiertas por un moho blanco esponjoso, convirtiéndose posteriormente en momias de color gris oscuro o negro (Reynaldi y col, 2003).

Existen microorganismos asociados a las abejas melíferas y a sus alimentos, incluyendo bacterias, mohos y levaduras (Gilliam, 1997), de las cuales, algunas podrían producir sustancias antimicóticas y otras sustancias inhibitorias que contribuyan al control de diversas enfermedades.

La asociación entre levaduras e insectos han sido extensamente reportadas en varios trabajos durante las últimas tres décadas (Batra y col, 1973; Shandu y Waraich 1985; Lachance y otros, 1990; Hagler y otros, 1993; Lachance y col, 1998; Lachance y col, 2001; Teixeira y col, 2003; Zacchi y Vaughan-Martini 2003; Lachance y col, 2005; De Vega y col, 2009; Unal y otros, 2009; Basukriadi y col, 2010). Siendo las levaduras (solos o en asociación con bacterias), los colonizadores pioneros durante la sucesión microbiana en células larvales de muchas abejas (Batra y col, 1973). Además, es importante rescatar el antagonismo que presentan las levaduras frente a diversos microorganismos, el cual se atribuye en principio a: (1) competencia por nutrientes; (2) cambios de pH en el medio; (3) producción de altas concentraciones de etanol; (4) secreción de compuestos antimicrobianos (Hatoum y col, 2012; Benítez-Ahrendts y Carrillo, 2017).

Este artículo evaluará dos cepas de levaduras del

género *Trichosporon* spp., con potencial capacidad para controlar *A. apis*, una aislada de intestino de abeja y la otra de *Varroa destructor*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se trabajó con dos cepas de levaduras del género *Trichosporon* spp.: las levaduras fueron aisladas del intestino de abejas (identificada con el número 3), y de la superficie de *Varroa destructor* (representada por el número 1), pertenecientes al apiario Severino (El Carmen, Jujuy), en medio extracto de Malta y agar, también conocido como medio MEA (extracto de malta 2 g, peptona 0,1 g, glucosa 2 g, agar 2 g, agua 100 ml, pH 5,6).

Se trabajó con cuatro cepas de *A. apis*, cada una ya identificada genéticamente: una cepa de *A. apis* española (KX622166), una cepa de *A. apis* procedente de la provincia de Entre Ríos (MH633695), otra proveniente de Misiones (MH633694) y una última cepa de Jujuy (MH633693). Todas pertenecientes al Laboratorio de Sanidad Apícola, Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu.

Las levaduras se cultivaron en 2 medios de cultivo: Agar-Polen (polen macerado 3 g, agar 2 g, agua 100 ml, pH 5) y medio MEA, para evaluar su potencial de crecimiento.

### Ensayo de inhibición

Primeramente se realizaron ensayos para comprobar el efecto inhibitorio de ambas cepas *Trichosporon* spp. frente a *A. apis* Española, Entrerriana, Misionera y Jujeña. Para esto, se realizaron suspensiones celulares (SC) de levadura a una concentración de 103UFC/mL en medio polen líquido y se sembró 20µL en posillos en placas con medio Agar-Polen, con los explantes correspondientes de *A. apis* colocados en el centro de las placas. También se realizaron pruebas de inhibición mediante la técnica de barrera sembrando dos líneas paralelas de levaduras y el explante del entomopatógeno en el centro. Se realizaron placas controles con cada una de las cepas, y cada ensayo fue realizado por duplicado utilizando Medio Agar-Polen.

Todos los cultivos fueron incubados a 30°C, bajo condiciones de microaerofilia por un lapso de 10 días. Después de este período, se midieron los diámetros y se registró la presencia de esporulación de las cepas de *A. apis*.

### Análisis estadístico

Los resultados de inhibición fueron expresados como Media  $\pm$  Desvío Estándar de los grupos control y de los tratamientos. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante ANOVA y la prueba de comparación entre medias de Tukey, con 0.05 de probabilidad de cometer error de tipo I, para ello se utilizó un paquete estadístico de InfoStat (Di Rienzo y col., 2008).

## RESULTADOS

### Potencial de Crecimiento de *Trichosporon* spp.

Las levaduras registraron un aumento de su concentración en Medio Polen y no así en MEA alcanzando concentraciones para el Medio Polen de  $6,2 \times 10^3$  UFC/ml y en el caso del Medio MEA:  $2,5 \times 10^3$  UFC/ml, para la levadura aislada de intestino de abeja; y para la levadura aislada de *Varroa destructor* en Medio Polen:  $5,3 \times 10^3$  ufc/ml, y  $2 \times 10^3$  UFC/ml para el Medio MEA.

### Efecto inhibitorio de Inhibición *Trichosporon* spp. de *A. apis* Española y *A. apis* Argentinas

Para la cepa *Ascospheara apis* española ambas levaduras lograron inhibir el crecimiento de *A. apis* española con ambas técnicas utilizadas, registrando para la colonia del entomopatógeno diámetros promedios de  $22,5 \pm 3,5$  mm con respecto al control  $68 \pm 7$  mm, no mostrando esporulación en ningún ensayo solo se registró el crecimiento a los 10 días de cultivo.

Las cepas de *Trichosporon* spp. lograron inhibir el crecimiento de la *A. apis* de Entre Ríos con la técnica seleccionada, registrando para la colonia del entomopatógeno diámetros promedios de  $51 \pm 1,41$  con la cepa *Trichosporon* spp. (1) y  $37 \pm 2,83$  con la *Trichosporon* spp. (3), con respecto al control  $64,5 \pm 0,71$ , no observando esporulación en ninguno de los ensayo a los 10 días de cultivo mostrando una diferencia significativa ( $p=0.001$ ). El análisis de

Tukey mostro que la cepa *Trichosporon* spp. (3), inhibe mejor el crecimiento de la cepa Entrerriana que la *Trichosporon* spp. (1) (Ver Tabla 1).

Las cepas de *Trichosporon* spp. lograron inhibir el crecimiento de la *A. apis* aislado de polenes de Jujuy con la técnica seleccionada, registrando para la colonia del entomopatógeno diámetros promedios de  $62 \pm 1,4$  *Trichosporon* spp. (1) y  $50 \pm 1,4$  con la *Trichosporon* spp. (3), con respecto al control  $71,5 \pm 0,7$ , no observando esporulación en ninguno de los ensayo a los 10 días de cultivo mostrando una diferencia significativa ( $p=0.009$ ). El análisis de Tukey mostro que la cepa *Trichosporon* spp. (3), inhibe mejor el crecimiento de la cepa Jujeña que la *Trichosporon* spp. (1) (Ver Tabla 1).

Las cepas de *Trichosporon* spp. lograron inhibir el crecimiento, pero no la esporulación de *A. apis* proveniente de Misiones con la técnica seleccionada, registrando para la colonia del entomopatógeno diámetros promedios de  $63 \pm 2,8$  *Trichosporon* spp. (1) y  $52 \pm 2,8$  con la *Trichosporon* spp. (3), con respecto al control  $78 \pm 0,7$ , mostrando una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.02$ ). Se observó esporulación a partir del día cinco en todos los tratamientos. El análisis de Tukey mostro que la cepa *Trichosporon* spp. (3), inhibe el crecimiento de la cepa Misionera mejor que la con *Trichosporon* spp. (1) que se comportó casi de la misma manera que el control (Ver Tabla 1).

Días	Tratamientos	Diámetro de Crecimiento de <i>A. apis</i> (mm)			Esporulación		
		ER	JUY	MIS	ER	JUY	MI
2	<i>T. spp</i> (1)	19,5±0,7	13,5±0,7	11±0,7	-	-	-
2	<i>T. spp</i> (3)	10,5±0,7	9	9±0,7	-	-	-
2	Control	14±1,4	17,5±0,7	16	-	-	-
5	<i>T. spp</i> (1)	29,5±0,7	27	20±0,7	-	-	-
5	<i>T. spp</i> (3)	24±0,7	20,5±2,1	14±0,7	-	-	-
5	Control	28±2,8	33±1,4	34±0,7	+	+	+
8	<i>T. spp</i> (1)	41±1,4	49,5±0,7	42±0,7	-	-	+
8	<i>T. spp</i> (3)	33,5±2,1	36	36±0,7	-	-	+
8	Control	50,5±2,1	60	57±1,4	+	+	+
10	<i>T. spp</i> (1)	51±1,41	62±1,4	63±2,8	-	-	+
10	<i>T. spp</i> (3)	37±2,8	50±1,4	52±2,8	-	-	+
10	Control	64,5±0,71	71,5±0,7	78±0,7	+	+	+

\*ER: Entre Ríos; JUY; Jujuy; MIS: Misiones; (-): sin esporulación; (+): con esporulación

Tabla 1. Se muestra el efecto inhibitorio *A. apis* Argentinas con dos cepas de *Trichosporon* spp. en diferentes días de cultivo

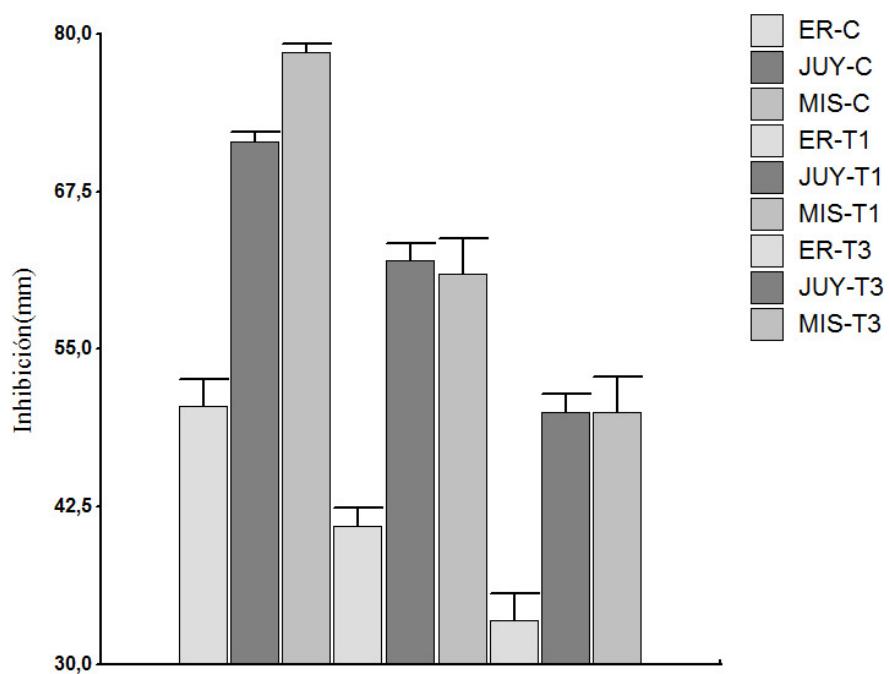


Figura 1. Efecto inhibitorio de *Trichosporon* spp. frente a cepas Argentinas a los diez días de cultivo

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evidenció el efecto inhibitorio de *Trichosporon* spp. aislados de intestino de abeja y de *Varroa destructor* sobre distintas cepas de *A. apis* seleccionadas (española, entrerriana, jujeña y misionera). Los resultados coinciden con Miao y col. (2009), el cual logró aislar cepas de levaduras inhibitoras de *A. apis*, pudiendo reducir la enfermedad.

En relación a la inhibición del crecimiento de *A. apis*-Entre Ríos, se observó que *Trichosporon* spp. proveniente del intestino de la abeja es más efectivo que *Trichosporon* spp. (1) que proviene de varroa. Con respecto a *A. apis* - Jujuy, se observó el mismo efecto que Entre Ríos lo que indicaría que el tratamiento *Trichosporon* spp. (3), es más efectivo al momento de inhibir el crecimiento del hongo *A. apis*. El Khoury y col (2018), revela que algunas levaduras podrían producir sustancias antimicóticas contra enfermedades fúngicas, tales como la cría yesificada, ya que estos microorganismos integran la microbiota huésped.

El efecto de las levadura sobre *A. apis* - Misiones revelaron que si bien disminuye su crecimiento el hongo entomopatógeno todavía esporula a los cinco días de cultivo. Es así, que si bien hay una disminución del crecimiento, ésta es mayor cuando se enfrenta con *Trichosporon* spp. (3) que con *Trichosporon* spp. (1). Gilliam y col. (1988), inocularon el patógeno *A. apis* en tortas de polen, introduciendo las mismas en varias colonias demostrando que algunas colmenas tenían más resistencia a este patógenos y otras más sensibles, esto estaría relacionando el comportamiento higiénico de las abejas, y a su alimentación ya que cuando se analizó, el pan de polen contenía un mayor porcentaje de levaduras lo que indicaría que estas mismas estarían protegiendo a la colmena de *A. apis*.

Se logró observar que la levadura proveniente del interior del intestino de abeja presenta mayor poder de inhibición, esto se debe a que forma parte de la microbiota intestinal de la abeja, desempeñando un papel importante en la prevención de enfermedades, al mismo tiempo que mejoran la resistencia de los huéspedes frente a parásitos intracelulares (El Khoury y otros, 2018), ya que regulan funciones específicas asociadas con el metabolismo y la respuesta inmunitaria (Evans y López, 2004; Alberoni

y otros, 2016).

## CONCLUSIÓN

Las levaduras utilizadas fueron capaces de inhibir el crecimiento y la esporulación de las cepas *A. apis* provenientes de Entre Ríos, Jujuy y España. Siendo más efectiva aquella cepa de *Trichosporon* spp., que fue aislada a partir de intestino de abeja. Sin embargo, no lograron detener la esporulación de *A. apis* misionera pero si el crecimiento.

Ambas levaduras podrían ser utilizadas como agentes biocontroladores del hongo entomopatógeno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., and Di Gioia, D. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9469–9482.
- Albo GN, Reynaldi FJ. 2010. *Ascospaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. *Revista Argentina de Microbiología*. 42:80.
- Aronstein KA, Murray KD. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103(Suppl.): S20-S29.
- Batra, L. R., Batra, S. W. T., & Bohart, G. E. 1973. The mycoflora of domesticated and wild bees (*Apoidea*). *Mycopathologia et Mycologia applicata*, 49(1), 13-44.
- Basukriadi, A., Sjamsuridzal, W., & Putra, B. B. 2010. Molecular identification and diversity of yeasts associated with *Apis cerana* foraging on flowers of *Jatropha integerrima*. *Microbiology Indonesia*, 4(1), 9.
- Benítez-Ahrendts M.R., Carrillo L. 2017. Inhibición de *Bacillus circulans* por una levadura. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 10 (17), 34-37.
- De Vega C, Herrera CM, Johnson SD. 2009. Yeasts in floral nectar of some South African plants: quantification and associations with pollinator type and sugar concentration. *S Afr J Bot* 75:798-806.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzanini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW, Grupo Infostat, versión 2008, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008.

El Khoury, S., Derome, N., Giovenazzo, P., Rousseau, A., Lecoeur, A., Mercier, P. L., ... & Castex, M. 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*, 6, 58.

Evans, J. D., and Lopez, D. L. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97, 752–756.

Gilliam, M., Taber III, S., Lorenz, B. J., & Prest, D. B. 1988. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascospaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2), 314-325.

Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS microbiology letters*, 155(1), 1-10.

Hagler LCM, Hagler AN, Kurtzman CP. 1993. Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 43:368-73.

Hatoum R, Labrie S, Fliss I. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology* vol. 3 art. 421.

Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M. 2015. Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of Apicultural Research*. 52(1):1-20.

Lachance MA, Starmer WT, Phaff H.J. 1990. *Metschnikowia hawaiiensis* sp. nov., a heterothallic haploid yeast from Hawaiian morning glory and associated drosophilids. *Int J Syst Bacteriol* 40:415-20.

Lachance MA, Rosa CA, Starmer WT, Schlag-Edler B, Barker JSF, Bowles JM. 1998. *Metschnikowia*

*continentalis* var. *borealis*, *Metschnikowia continentalis* var. *continentalis* and *Metschnikowia hibisci*, new heterothallic haploid yeasts from ephemeral flowers and associated insects. *Can J Microbiol* 44:279-88.

Lachance MA, Starmer WT, Rosa CA, Bowles JM, Barker JSF, Janzen, DH. 2001. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res* 1:1-8.

Lachance M-A, Ewing CP, Bowles JM, Starmer WT. 2005. *Metschnikowia hamakuensis* sp. nov., *Metschnikowia kamakouana* sp. nov. and *Metschnikowia mauinuiana* sp. nov., three endemic yeasts from Hawaiian nitidulid beetles. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1369-77.

Miao, W. A. N. G., Ju-Cui, Y. I. N., & Shao-yu, H. E. (2009). Screening of Yeast Against Chalkbrood Disease. *Journal of Bee*, 5, 008.

Padilla F, Flores JM, Campano F. 2014. Control de la ascosferosis (*Ascospaera apis*) mediante el uso de fondos higiénicos de rejilla. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)*. 4: 289-291.

Reynaldi FJ, López AC, Albo GN, Alippi AM. 2003. Differentiation of *Ascospaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *Journal of Apicultural Research*. 42:68-76.

Reynaldi FJ, de Giusti MR, Alippi AM. 2004. Inhibition of the growth of *Ascospaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. *Revista Argentina de Microbiología*. 36(1): 51-55.

Shandu DK, Waraich MK. 1985. Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microb Ecol* 11:51-8.

Teixeira ACP, Marini MM, Nicoli JR, Antonini Y, Martins RP, Lachance MA, Rosa CA. 2003. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:339-43

Unal S, Yaman M, Tosun O, Aydin C. 2009. Occurrence of Gregarina typographi (*Apicomplexa*,

*Gregarinidae)* and *Metschnikowia typographi* (Ascomycota, *Metschnikowiaceae*) in *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) populations in Kastamonu (Turkey). *J Anim Vet Adv* 8:2687-91.

Zacchi L, Vaughan-Martini A. 2003. Distribution of three yeast and yeastlike species within a population of soft scale insects (*Saissetia oleae*) as a function of developmental age. *Ann Microbiol* 53:43-6.