



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS

“José Martí Pérez”

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Agronomía

Trabajo de Diploma

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL ESTÓMAGO E INTESTINO DE ABEJAS (*Apis mellifera* L).

Autor: Manuel Alejandro Amaró Valmaseda.

Sancti-Spíritus, 2017

“Año 59 de la Revolución”



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS

“José Martí Pérez”

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Agronomía

Trabajo de Diploma

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL ESTÓMAGO E INTESTINO DE ABEJAS (*Apis mellifera* L).

Autor: Manuel Alejandro Amaró Valmaseda.

Tutores: Dr. Juan Emilio Hernández García.

Dr. M.V.Z. José Antonio Rodríguez Díaz

Sancti-Spíritus, 2017

“Año 59 de la Revolución”

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spíritus; entre los meses de noviembre- abril 2017. El trabajo tuvo como objetivo caracterizar *in vitro* un grupo de bacterias ácido lácticas aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*) para evaluar su potencial probiótico, para lo que se realizaron un grupo de pruebas necesarias para considerar a las BAL como posibles probióticos entre ellas identificación fenotípica, producción de peróxido de hidrógeno, hidrólisis de la caseína de la leche, prueba de coagulación, actividad hemolítica, crecimiento a diferentes temperaturas y la prueba de Inhibición de las BAL frente a *Paenibacillus larvae*. Se obtuvo como resultado que todas las cepas fueron compatibles con la morfología de las bacterias ácido lácticas tipo *Lactobacillus*, el 80 % de las cepas resultaron positivas a la prueba de producción de peróxido de hidrogeno, las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a 37⁰C, con crecimiento abundante, mientras que a 45⁰C únicamente creció abundante *Fructobacillus fructosus* (72) y *Lactobacillus rhamnosus* (73), Solo se apreció hidrólisis de la caseína a las 24 h en *Fructobacillus fructosus* (72),se comprobó que solo *Fructobacillus fructosus* (66) fue negativa a la prueba de coagulación en todos los tiempos y ninguna de las cepas evaluadas reveló fuerte actividad hemolítica, se pudo observar que *Fructobacillus fructosus* (66), en ninguno de los tiempos y técnicas mostró inhibición frente a *Paenibacillus larvae* y *Lactobacillus kunkeei* (70) solo lo hizo en la técnica de Spot.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a:

Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presentaron.

Le agradezco a mis padres Rolando y Raizys, ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, son los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, son los que han velado por mi salud, mis estudios, mi educación. Es a ellos a quienes les debo todo sus consejos, regaños, reprimendas de las cuales estoy muy seguro los han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de los cuales me siento extremadamente orgulloso.

Les agradezco a mis hermanos Víctor y Adianys que han estado siempre a mi lado, por su soporte y compañía, por creer en mí y ser un ejemplo de dedicación y esfuerzo. Los amo mucho

A mis abuelas por ser el ejemplo un de mujer luchadora y perseverante, por enseñarme que la vida no es fácil y sin embargo, que hay que luchar cada día por ser mejor.

A mis amigos de siempre, de la Universidad, a mi familia y a todas las personas que de una u otra manera han tocado mi vida, gracias....ya que cada experiencia vivida con cada persona es irrepetible. Cuando quieres realmente una cosa, todo el Universo conspira para ayudarte a conseguirla, además todos los días Dios nos da un momento en que es posible cambiar todo lo que nos hace infelices. El instante mágico es el momento en que un sí o un no pueden cambiar toda nuestra existencia.

Gracias a todos.

Manue

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más profundos agradecimientos a las personas más cercanas y a las personas que han permitido el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Emilio Hernández García, por ser un gran tutor además de permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Al, Dr. M.V.Z. José Antonio Rodríguez Díaz por su apoyo y dedicación a este trabajo todo el tiempo.

A María y Kenya por su apoyo y paciencia en las prácticas de laboratorio y sobre todo por brindarme su amistad.

Al Dr. Lauriano, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo y por todas las enseñanzas q nos dejó.

.

A los directivos del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), por la oportunidad brindada y el apoyo que me ofrecieron.

A todo el personal del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA) que colaboraron desinteresadamente en la realización de éste trabajo, muchas gracias Muchachos

A mis compañeros de la “U” por las experiencias vivida, los gratos momentos y por todo su apoyo, nunca los voy a olvidar.

Pensamiento

Resumen

Dedicatoria

Agradecimientos

Introducción.

1. Revisión bibliográfica.

1.1.1. Apicultura. Definición.

1.1.2. La apicultura en el contexto agrícola y pecuario mundial.

1.1.3. La Apicultura en el contexto agrícola y pecuario cubano.

1.1.4. La apicultura. Relación con la seguridad alimentaria

1.2.1. Las Abejas (*Apis mellifera*).

1.2.2. Clasificación de las abejas melífera.

1.2.3. Anatomía de la abeja

1.2.4. Las abejas como agentes polinizadores.

1.3.1. Enfermedades que afectan a las abejas melíferas en Cuba.

1.3.2 Inmunidad de las abejas.

1.4.1. Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena.

1.4.2. Géneros predominantes de la microbiota del tracto gastrointestinal de las abejas melíferas.

1.4.3. Evolución y definición del término probiótico

1.4.4. Trabajo con Probióticos en abejas.

1.4.5. Probióticos empleados en apicultura

2. Materiales y métodos de investigación

2.1.1. Delimitación de la Investigación.

2.2.1. Origen de las Cepas

2.3.1. Identificación fenotípica.

2.3.2. Tinción de Gram

2.3.3. Tinción de esporas

2.4.1. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

2.4.2. Hidrolisis de la caseína de la leche (proteólisis).

2.4.3 Prueba de coagulación.

2.4.4. Actividad hemolítica.

2.4.5. Crecimiento a diferentes temperaturas.

2.4.6. Prueba de Inhibición de las BAL frente a *Paenibacillus larvae*.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.1 Identificación fenotípica.

3.2.1. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

3.2.5. Crecimiento a diferentes temperaturas.

3.2.2. Hidrolisis de la caseína de la leche (proteólisis).

3.2.3 Prueba de coagulación.

3.2.4. Actividad hemolítica.

3.2.6. Prueba de Inhibición de las BAL frente a *Paenibacillus larvae*.

Conclusiones.

Recomendaciones.

Bibliografía.

Introducción.

Las abejas, *Apis mellifera*, es uno de los más importante insectos en el ecosistema terrestre, no solamente por la producción de miel, dadas sus virtudes nutritivas y terapéuticas, sino además por su papel esencial como polinizadores de diferentes especies de plantas entomófilas (Kremen et al., 2007; Demedio et al., 2011). De las abejas depende la supervivencia y evolución de más del 80 % de las especies vegetales del planeta con peso económico importante en muchos países (Morse y Calderone, 2000, Verde 2014).

Actualmente las colonias de la abeja son amenazadas por numerosos agentes patógenos, incluyendo virus, hongos, bacterias, y protozoos. El Loque americana, *Nosema ssp* y la *Varroa ssp* constituyen los patógenos más importantes de esta especie y aún constituyen los principales peligros de salud en la apicultura (Genersch et al., 2006; Rosenkranz et al., 2010; Evans y Schwarz, 2011; Higes et al., 2013).

Para controlar o minimizar el efecto de esos patógenos frecuentemente las estrategias incluyen el uso de antibióticos y pesticidas que no solamente puede generar la resistencia de los patógenos, sino que además crea un desbalance de la microbiota normal de la abeja (Miyagi et al., 2000; Evans, 2003). Estos factores más tarde afectan la salud del insecto alterando la orientación y consecuentemente reduciendo el número de miembros de las colmenas (Barnett et al., 2007).

Además, el uso de antibióticos y productos químicos aumentan o incrementan el riesgo de contaminación de los productos de las colmenas porque ellos pueden persistir en la miel y como consecuencia afectar su calidad con repercusión en la salud del consumidor (Martel et al., 2006). Situación que pone en riesgo la comercialización del producto en el mercado interno y externo.

Una alternativa ante esa problemática es el uso de microorganismos probióticos en la profilaxis y terapia de diversas enfermedades de los animales y el hombre (Nava et al., 2004). Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en forma adecuada al huésped producen efectos benéficos sobre su salud” (FAO, 2006).

Las bacterias del género *Lactobacillus* y las levaduras han sido las más estudiadas con esos fines. Muchas de estas especies son habitantes importantes del tracto intestinal del hombre y los animales.

El sector apícola debe enfrentar las circunstancias actuales con el apoyo de políticas que lo visualicen como un renglón importante a incluir en las estrategias agropecuarias, ambientales, comerciales y educativas, establecidas por los gobiernos para obtener resultados óptimos en la producción de alimento y, a su vez, asegurar que sean inocuos, de calidad inobjetable, rentables y sostenibles.

Dentro de las fortalezas del sector apícola cubano, vinculadas con la seguridad y la soberanía alimentaria nacional, resalta el manejo integrado para el control de las enfermedades donde se propone el control de las enfermedades transmisibles sin el uso de medicamentos. Esto ayuda a obtener producciones más inocuas.

El desarrollo de nuevas estrategias con un enfoque integral que persiga mejorar globalmente el rendimiento y el bienestar de las abejas, así como reducir la presencia de patógenos y gérmenes oportunistas en las explotaciones apícolas, se seguirá intensificando en los próximos años, ante el futuro marco legislativo referente a la salud y la nutrición de esta especie. Es bien conocido el enorme riesgo que representa para la salud pública la posible aparición de genes de resistencia en bacterias para antibióticos comúnmente empleados en terapéutica humana como consecuencia de su uso indiscriminado en la producción. Una alternativa a esa problemática pasaría por la manipulación de la microbiota del tracto digestivo mediante la administración de probióticos para así promover la salud intestinal del insecto, a través de una mayor diversidad microbiana, la estabilidad de la misma, sus metabolitos y sus interacciones con el epitelio y el sistema inmune.

A medida que la resistencia a los antibióticos aumenta, la necesidad de encontrar nuevas alternativas es urgente por lo que el uso de las bacterias lácticas de las abejas podría ser una. Las bacterias lácticas intervienen en la colonia completa por medio de la producción de sustancias bioactivas que funcionan como una barrera de defensa contra los patógenos de las abejas.

Más que en un enfoque terapéutico, este tipo de aditivos puede encontrar su

principal aplicación en la prevención o profilaxis de infecciones ya que su acción, al contrario de los antibióticos, no se centra tan sólo en atacar directamente a agentes patógenos, sino en modular el medio ambiente gastrointestinal y, de esta manera, reducir el riesgo de enfermedades en sinergia con el sistema defensivo del insecto huésped. Además, el uso de antibióticos y productos químicos aumentan o incrementan el riesgo de contaminación de los productos de las colmenas porque ellos pueden persistir en la miel y como consecuencia afectar su calidad con repercusión en la salud del consumidor e influyendo en su comercialización.

Numerosos investigadores han realizado estudios sobre organismos cultivados de intestino de abejas y de colmenas, documentándose una variedad metabólica y actividad funcional (Evans y Armstrong, 2006).

Los *Lactobacillus* son ampliamente considerado como probiótico, a partir de que su presencia es beneficiosa para la salud del organismo huésped (Kleerebezem y Vaughan, 2009). Los *Lactobacillus* asociado a las abejas se incluyen en dos clones principales, "Firm-4" y "Firm-5" BABENDREIER, et al., 2007; Martinson et al., 2011; Moran et al., 2012). *Lactobacillus* es el grupo más abundante en el intestino de la abeja y - se ha estimado - comprende 20-99 % de bacterias en las obreras individuales (Moran Et Al., 2012). Para considerar un BAL como probiótico es necesario previamente realizar una serie de ensayos a nivel de laboratorio y condiciones de producción (FAO).

El papel de microbios simbióticos del intestino en la digestión, la resistencia a enfermedad contagiosa, y la salud en general de las abejas melíferas que puede verse expresada tanto en lo individual como a nivel de toda la colonia es un área en la que aún se necesita seguir investigando para su esclarecimiento. Engel 2013)

Problema científico.

¿Las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*) tienen propiedades que permiten su uso como potencial probiótico?

Hipótesis:

A partir de aislamientos de BAL del estómago e intestino de abejas sanas (*Apis mellifera*) es posible encontrar cepas con propiedades probióticas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *in vitro* un grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*) para evaluar su potencial probiótico.

Objetivos Específicos.

Identificar fenotípicamente las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*).

Caracterizar *in vitro* las propiedades probióticas de las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*).

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

1.1.1. Apicultura. Definición.

Etimológicamente apicultura proviene de los términos del latín Apis (abeja) y Cultura (cultivo), y según la Real Academia de la Lengua Española se define como el arte de criar abejas para aprovechar sus productos”. Para PierreJean-Prost, Ingeniero agrónomo y apasionado por la apicultura es definida como “la ciencia de la cría y mantenimiento de las abejas con vista a obtener de su trabajo dirigido a la producción de miel, cera, polen y jalea real como principales productos de colmenar. A todo ello se suma el beneficio producido por la actividad apícola en la agricultura y diversidad vegetal, producto de la función polinizadora que realizan estos insectos sobre las plantas cultivadas y silvestres, mientras realizan las labores de pecoreo o búsqueda de alimentos.

1.1.2. La apicultura en el contexto agrícola y pecuario mundial.

Hasta mediados del siglo XVIII, en la mayoría de los países se practicaba una agricultura de subsistencia, hecho que cambió a partir del siglo pasado, bajo la presión del desarrollo demográfico y el aumento de la demanda de alimentos. Esto obligó a rediseñar (sobre todo en los países desarrollados) los sistemas productivos agrícolas y agropecuarios por otros modernos e intensivos y a incorporar nuevas áreas agrícolas, muchas de ellas con cultivos-incluso transgénicos o monocultivos no melíferos en grandes extensiones de terreno- para producir biocombustibles o alimentos. Todos estos son dependientes de plaguicidas que, por paradoja, también en el caso de los cultivos entomófilos, dependen de las abejas como agentes polinizadores (Yangari 2008 y Ribeiro 2008).

Estos ecosistemas productivos, agrícolas o agropecuarios, tienen marcadas diferencias que repercuten en la disponibilidad de los alimentos para las familias de abejas y en el modo de practicar la apicultura. A su vez, los cambios en la demanda de alimentos, modifican los sistemas productivos apícolas por otros modernos e intensivos que dan respuesta a los nuevos contextos, como parte del entramado de relaciones que se establecen entre los sistemas agrícolas y

agropecuarios, y que hacen del hombre el principal intermediario entre el animal y el ecosistema donde se inserta y produce.

La apicultura mundial se trabaja hoy en ecosistemas que, en su mayoría, se encuentran deteriorados por causas antrópicas. Se incluye aquí el impacto drástico que provocan las guerras, la pérdida de flora melífera por la tala o poda indiscriminada, la urbanización, los desplazamientos de asentamientos humanos hacia áreas que fueron antes de flora silvestre entomófila, los cultivos abundantes en flora melífera, los bosques nativos profusos en vegetación arbórea y sotobosques melíferos, así como la introducción de especies invasoras, las contaminaciones ambientales o la fragmentación de los hábitats naturales.

En el caso de los ecosistemas agrícolas, el intenso laboreo de la tierra tiende a reducir, y hasta destruye los nichos naturales de insectos polinizadores. De esta forma, la agricultura intensiva se desarrolla según modelos cada día más dependientes de la apicultura moderna e intensiva (casi siempre trashumante) con abejas melíferas, sometida a presiones y modificaciones antrópicas complejas o al límite con su existencia, que la conducen a un equilibrio precario, de no ser racional y eficaz la intervención del hombre como mediador entre las colonias de abejas y los ecosistemas productivos, donde estos insectos siguen siendo protagonistas como polinizadores. (Natalichio 2008).

No se debe desestimar el efecto de la agricultura intensiva en la biodiversidad, donde resulta baja la conservación de los nutrientes por la lixiviación del terreno y la exportación de las cosechas que se llevan en sí el aporte de estos componentes y el agua. Este tema es poco estudiado en lo que respecta al efecto de este tipo de agricultura en la nutrición y el equilibrio de las abejas insertas en estos agroecosistemas (Verde y Chan, 2005, Verde 2014).

1.1.3. La Apicultura en el contexto agrícola y pecuario cubano.

En Cuba la apicultura está incluida como una rama agropecuaria de interés para el Ministerio de la Agricultura y se contempla entre las estrategias de desarrollo agropecuario, respaldada por políticas que propician la cohesión del sector. Se contribuye así a la integración de este con otras esferas de la sociedad:

universidades, escuelas técnicas, centros de investigación y ministerios, entre otro.

De igual forma el manejo integrado para el control de las enfermedades incluye el control de las enfermedades trasmisibles sin el uso de medicamentos, ayudando así a obtener producciones inocuas (MINAG, Resolución 547/2013).

La apicultura en Cuba es considerada como una actividad importante, por constituir un recurso productivo exportable y una forma de vida que permite la conservación de la diversidad biológica, su explotación está enfocada hacia un sistema empresarial moderno, trashumante e intensivo. El sistema de atención a la especie tiene como meta alcanzar el incremento sostenido de “producciones limpias” y de calidad inobjetable, lo que sólo es posible lograr con buenas prácticas zootécnicas y sanitarias en cada punto de la cadena productiva, para mantener colmenas sanas y en equilibrio con el medio donde se desarrollan (Verde y Chan, 2005, Verde 2014). Solo con esas premisas se mantiene la calidad exportable, según los requisitos exigidos por los miembros de la Unión Europea, convertidos en los mayores compradores de la miel de la Isla.

1.1.4. La apicultura. Relación con la seguridad alimentaria

El acceso físico, social y económico de todas las personas, y en todo momento, a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida activa y sana, son los rasgos que definen la seguridad alimentaria. Se habla también de este concepto cuando se aseguran alimentos sanos al alcance de todos (Martín y AA.VV. 2009).

En el caso de la apicultura, su vínculo con la seguridad alimentaria debe abordarse desde diversas perspectivas: como elemento biológico indispensable para asegurar con la polinización, la calidad y los rendimientos de los cultivos entomófilos; por su impacto en la biodiversidad y el equilibrio hídrico, que a su vez garantiza y favorece los cultivos de los alimentos que participan en la cadena trófica del hombre, y por las producciones de alimentos que genera con la necesaria inocuidad que deben tener para el consumo de forma directa por el hombre.

La inocuidad de los alimentos que se consumen es una condición inherente al concepto de seguridad alimentaria. Los productos de la colmena tienen que cumplir los parámetros que se establecen para este fin. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado reiteradamente que las enfermedades de origen alimentario, como las toxiinfecciones alimentarias (TIA) o las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) figuran entre los problemas más acuciantes de los sistemas de salud pública (Martín y AA.VV. 2009).

Por ello, se han establecido normas internacionales que la industria apícola precisa cumplir para la producción y el comercio de los alimentos. Corresponde a los servicios veterinarios de un país el establecimiento de controles sanitarios en toda la cadena productiva, que permitan velar por la ausencia de residuos químicos, sustancias prohibidas, contaminaciones microbiológicas o partículas groseras en los productos de la colmena (Verde et al. 2012).

En la agricultura, las abejas aseguran prácticamente la producción de todas las especies de frutales y cítricos (aguacate, mango, limón, naranja, mandarina) y las cucurbitáceas (calabaza, melón de Castilla, sandía o “melón de agua”, pepino, entre otros). También intervienen en las producciones de fresa, manzana, durazno, cereza, cebolla, tomate, pimiento, quimbombó, berenjena, habichuela, frijoles, pera, kiwi, alfalfa, trébol, girasol, algodón, cártamo, soya, especies de palmas, mora blanca y ciruelos, cerezos, entre otros (Demedio et al. 2011).

Sin embargo, en la actualidad la polinización entomófila se está enfrentando al problema de la disminución progresiva de las abejas a causa de factores como las patologías apícolas, las transformaciones de suelos forestales en agrícolas y la urbanización intensiva, disminuyendo las fuentes de polen y néctar que son la base de la dieta de las abejas. Esta situación provoca un decaimiento general del ecosistema, pues ellas ayudan a perpetuar la vida vegetal (Calatayud y Simó). Otro de los factores que afectan la población de abejas es el uso de agroquímicos en la agricultura, los cuales han intoxicado un gran número de colonias durante las últimas décadas (Publicado Revista FAO, Diciembre 2005), por lo que es fundamental usar productos que no generen impacto ambiental.

1.2.1. Las Abejas (*Apis mellifera*).

Las abejas se encuentran íntimamente ligadas a la evolución del hombre como ser social. Presentes en la tierra hace más 60 millones de años, el desarrollo evolutivo del insecto, mantuvo estrecha dependencia con el de las plantas con flores, frutos y semillas. Existen evidencias fósiles de las abejas muy anteriores a las del hombre. De esta relación planta – insecto, surge la importancia ecológica y económica que hoy se atribuye a la abejas. (Verde et al. 2013).

Apis mellifera o abeja melífera, es un insecto social con actividades o funciones que están condicionadas por la época del año y las edades de los individuos hembras y machos que la integran y forman las castas. Cada colonia tiene dos castas femeninas: una reina y 25 000 a 80 000 obreras y una casta masculina, zángano que llegan a cientos, cuando la colonia está en fase de multiplicación. (Sanidad apícola, colectivo de autores 2002)

Como características de los insectos sociales, las colonias de abejas melíferas poseen división del trabajo: las obreras jóvenes alimentan y atienden a la reina y las crías, las obreras más viejas se encargan de coleccionar polen, néctar, propóleos, agua y defienden a la colonia de posibles invasores. Las abejas obreras adultas regulan la temperatura y la humedad del nido (homeostasis) asegurando valores prácticamente constantes, aun cuando varíen las condiciones ambientales externas. Cualquier variación de estas conductas, denota pérdida de bienestar o conducen al deterioro de la salud. (Sanidad apícola, colectivo de autores 2002)

1.2.2. Clasificación de las abejas melífera.

Reino:	<i>Animalia</i>
Filo:	<i>Arthropoda</i>
Clase:	<i>Insecta</i>
Orden:	<i>Hymenoptera</i>
Suborden:	<i>Apocrita</i>
Superfamilia:	<i>Apoidea</i>

Familia:	<i>Apidae</i>
Subfamilia:	<i>Apinae</i>
Tribu:	<i>Apini</i>
Género:	<i>Apis</i>
Especie:	<i>A. mellifera</i> LINNAEUS, 1758

La evolución de la clase Insecta y del orden Hymenoptera, donde figuran las abejas que habitan en los cultivos, bosques y jardines, ocurrió en el período Jurásico, hace aproximadamente 180 millones de años, como resultado de la coevolución de las plantas con flores, las que, al tener ovarios y estigmas (fanerógamas y angiospermas), dependían de los insectos para poder realizar su reproducción (polinización entomófila), hecho que a su vez determinó la evolución de la familia Apidae y del género Apis en el período del Eoceno de la era Cenozoica o Terciaria, razones que se han documentado de manera irrefutable a partir de hallazgos fósiles (Carpana 2004).

De las tres subfamilias que conformaron la familia Apidae (Meliponinae, Bombinae y Apinae), logró alcanzar mejores adaptaciones la Apinae, lo que permitió que fuesen más cosmopolitas. El género Apis consiguió mayor distribución en el mundo, con ecotipos de clima tropical y templado y una amplia diversidad de subespecies. Este hecho conllevó al establecimiento de distintas razas de abejas, como Apis mellifera o abeja negra alemana y Apis mellifera ligústica o abeja italiana, presentes en el genofondo de la abeja criolla cubana (ACPA 2010).

Las abejas africanas, que se trabajaban en regiones del África, solo adquirieron interés económico y social cuando se introdujeron por el hombre en América y se cruzan con las razas locales, lo que originó un híbrido que se expandió por todo el continente.

1.2.3. Anatomía de la abeja

Las abejas, como todos los insectos, poseen un cuerpo dividido en 3 partes: cabeza (contiene órganos sensoriales), tórax (posee órganos locomoción) y abdomen (tiene órganos digestivos y de la reproducción). Poseen un exoesqueleto constituido por quitina. Una colonia de abejas está integrada por 3 tipos de individuos:

- Abeja reina: posee el cuerpo más largo y ancho que las obreras, la cabeza es ligeramente cuadrada y, el abdomen es alargado y de forma cónica. Sus alas, cuando están plegadas, no alcanzan a cubrir el último tercio del abdomen. Pesa de 200 a 250 mg (Pesante, D. 2010)
- Zángano: posee una cabeza casi esférica, por la disposición de sus ojos compuestos. El tórax es fuerte y de mayor diámetro que el de las obreras y reinas; el abdomen es ancho, con la porción terminal ligeramente redondeada. Pesa de 180-200 mg. (Pesante, D. 2010)
- Obreras: son de menor tamaño que los anteriores. La cabeza es triangular, por el menor desarrollo de los ojos compuestos. Sus alas, a diferencia de la reina, cubren totalmente el abdomen cuando están plegadas. Pesa de 100-130 mg. (Pesante, D. 2010)

1.2.4. Las abejas como agentes polinizadores.

La polinización es un proceso que permite mantener la vida vegetal en el planeta, en donde las plantas producen semillas y frutos por medio del intercambio de polen entre las flores. Uno de los tipos de polinización es la polinización entomófila, en donde insectos polinizadores trasladan el polen desde las anteras (parte masculina de una flor) hasta los estigmas (parte femenina), ya sea de la misma planta o de otras que se encuentren en los alrededores (Bradbear, 2005)

En el caso de las plantas cultivadas por el hombre, la polinización entomófila permite la obtención de semillas y aumentar tanto la calidad como la cantidad de los frutos. Por ser esta función necesaria e insustituible en la mayoría de los casos, es conveniente proteger a los insectos polinizadores como la abeja *Apis mellifera* (Calatayud y Simó).

Para que ocurra la polinización entomófila, en primera instancia la abeja exploradora debe visitar y recorrer el lugar, optando por el área más nutritiva para la producción de miel. Una vez definido este lugar, da la orden para que las demás abejas trabajen en esa área específica. Su comportamiento al manipular las flores, las convierte en polinizadoras muy eficaces, gracias a dos cualidades primordiales: visitan muchas flores por unidad de tiempo y muestran una gran fidelidad a la especie de planta a la que se dirigen en cada vuelo. Este grupo de insectos son los que mejor aprovechan los recursos ofertados por las flores: el polen como fuente básica de principios inmediatos y el néctar como combustible metabólico (Calatayud y Simó).

Todas las abejas presentan características anatómicas, fisiológicas y conductuales que las hacen dependientes de las plantas: necesitan del polen y del néctar para alimentarse, reproducirse y mantener sus crías. Precisan de las resinas (propóleos) para impermeabilizar y proteger sanitariamente a la colonia. Son como “mecanismos perfectos”, diseñados por la naturaleza para la polinización (ACPA 2010).

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) desempeñan una función protagónica por su actividad polinizadora insustituible, ante una agricultura cada vez más moderna e intensiva. El hombre no puede manejar con estos fines mariposas, coleópteros, murciélagos o pájaros. Son las abejas, populosas y dependientes de las plantas, las que se ocupan de polinizar infinidad de cultivos que forman parte de la cadena trófica del hombre (Verde et al. 2013).

Ecosistemas y abejas. La Ley 165 para el Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica (ONU 1994), en su artículo 2, define el término ecosistema como un complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos y su medio no viviente que interactúan como una unidad funcional. De hecho, la unidad funcional en la apicultura es la colmena.

La colmena está formada por un conjunto de individuos (las abejas) y los elementos orgánicos e inorgánicos que, a manera de un complejo dinámico, a su vez, interactúa con las comunidades de elementos vegetales, animales y su medio no viviente (Verde 2010).

La colonia como un todo, es la unidad biológica funcional que se relaciona y forma parte indisoluble de los ecosistemas donde habita. Está marcada por la conducta gregaria de esta especie.

El hombre apareció mucho después que la abeja. La abeja no cambió, solo realizó adaptaciones a los diversos hábitats y modificó sus respuestas conductuales, como opción adaptativa ante los disímiles cambios que el hombre fue imponiendo al insecto para cubrir sus necesidades productivas o por la transformación que hizo y hace de los ecosistemas y escenarios productivos.

La evolución de los insectos, las plantas entomófilas y las abejas se estima, aproximadamente, en 50 millones de años. Los homínidos, es decir, la familia a la que pertenece la especie humana (*Homo sapiens*), ha dejado evidencias fósiles que no van más allá de los 600 000 años. El hombre reconoció a la abeja y con ella, la miel como alimento dulce, mucho después que esta hubiera asumido la importante función de la polinización, principal contribución del insecto como dinamizador de la diversidad biológica y del equilibrio de los ecosistemas. (Carpana 2004)

Las abejas aseguran 65 % de la reproducción de las plantas, representan 20 % de las 100 000 especies de insectos que se incluyen en la clase Insecta y el orden Hymenoptera. Dependen de las flores para subsistir, y muchas de las especies vegetales que para su reproducción y supervivencia dependen del género *Apis*, integran la cadena alimentaria del hombre (Carpana 2004).

De las 100 especies de vegetales que proveen 90% de los abastecimientos de alimento en 146 países, 71 son polinizadas por las abejas, mientras que 80% de las especies de plantas silvestres son fecundadas por insectos. Sin abejas no hay polinización. Sin polinización no hay semillas. Sin semillas no hay frutos ni rendimientos de los cultivos entomófilos ni alimentos suficientes para los animales y el hombre. Se rompería la cadena trófica, desaparecerían especies de plantas y animales, se afectaría el ciclo del agua y el hambre y la desertificación se adueñarían de nuestros campos (Yangari 2008).

La polinización por abejas representa entre 73 y 88 % de la polinización entomógama (entomófila), mientras que a otros himenópteros (abejorros, abejas

solitarias, entre otros) se les atribuye de 6 a 21%. Al resto de los insectos solo corresponde entre 6 y 14 %. Cada año, las abejas melíferas polinizan plantas y plantaciones con valor estimado en 40 billones de dólares, más de un tercio de la producción de alimentos en muchos países. En Europa, 84% de la producción de las especies cultivadas dependen directamente de la polinización entomófila (APITRACK 2008 y Noticias ApiNews 2013).

1.3.1. Enfermedades que afectan a las abejas melíferas en Cuba.

El estado sanitario de las colmenas es tanto más satisfactorio cuando mejor se adaptan a los factores ecológicos. La adaptación incompleta se manifiesta por la disminución del rendimiento y por la predisposición a las enfermedades. Uno de los factores que interviene en el desencadenamiento de las enfermedades apícola es la escasez de alimentos cuando la floración disminuye, siendo necesario realizar traslados de colmenas a las zonas costeras y/o suministrar alimentos a las abejas. Este cambio para la familia de abejas es un factor importante para el surgimiento de las enfermedades. Otro aspecto del problema ecológico se refiere a la productividad del medio y sus relaciones con el ciclo biológico de las abejas. La producción es cíclica y muy variable de un lugar a otro, no es ilimitada, todo lo que actúa sobre la producción lo hace también sobre las abejas (González 2002).

De acuerdo a los reportes de Verde et al (2013), las principales enfermedades involucradas en la salud apícola en Cuba son: *Loque americana (Paenibacillus larvae)*, *Loque europea (Paenibacillus alvei)*, *Nosemosis (Nosema apis)*, *Varroosis (Varroa destructor)* y *Acariosis (Acarapis Woodi Rennie)*

1.3.2. Inmunidad de las abejas.

La división del sistema inmune de los insectos en humoral y celular la podemos considerar como clásica. Los humores son líquidos y obviamente la hemolinfa es un líquido que funciona como un sistema de transporte de diferentes compuestos (moléculas), en el que también podemos encontrar varios tipos celulares que se denominan hemocitos (Padilla et al.; 2009).

La base del sistema inmune de las abejas se encuentra en la información almacenada en los genes, por lo tanto para hablar de este tema tenemos que ir a un nivel genómico y estudiar diferentes genes para conocer cómo se expresan

(Evans et al.; 2006, Wilson-Rich et al.; 2008). Recientemente se ha identificado un gen en abejas que tiene un papel preponderante en la codificación de la respuesta ante patógenos.

En la hemolinfa de las abejas viajan diferentes moléculas y compuestos que pueden atacar a los agentes patógenos y que reciben el nombre de respuesta humoral. Dicha respuesta humoral está formada por los siguientes sistemas: (1) péptidos y proteínas antimicrobiales, (2) sistema de la fenoloxidasa, (3) cascadas Enzimáticas que regulan la melanización y coagulación de la hemolinfa y (4) producción de reactivos intermedios de oxígeno y nitrógeno (Lavine y Strand 2002).

De igual forma se describe en las abejas una inmunidad social, conocido como desparasitación o “grooming”, el mismo consiste en la retirada de objetos o patógenos de sí mismo o de un compañero (Padilla et al.; 2009).

1.4.2. Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena.

En relación a la flora bacteriana del intestino de la abeja (*Apis mellifera*), se ha demostrado que los huevos, larvas y abejas que recién emergen están libres de gérmenes, y la colonización del intestino ocurre cuando las larvas son alimentadas con jalea real por las abejas nodrizas.

En las abejas el intestino constituye el primer lugar donde se verifica el proceso de digestión del alimento, así como el sitio donde pueden instaurarse una serie de patógenos, incluyendo el *Paenibacillus larvae* (de Graaf et al., 2013), *Ascosphaera apis* (Jensen et al., 2013) *Nosema ceranae* (Fries et al., 2013), y probablemente muchas otras enfermedades virales (Miranda et al., 2013).

Los estudios sobre la biología de los microorganismos del tracto intestinal se han incrementado progresivamente, reconociendo su papel benéfico en muchos aspectos de la salud de los animales, animales tan diversos como mamíferos e insectos. El papel de microbios simbióticos del intestino en la digestión, la resistencia a enfermedad contagiosa, y la salud en general de las abejas melíferas puede verse expresada tanto en lo individual como a nivel de toda la colonia, es

un área en la que aún se necesita seguir investigando para su esclarecimiento (Engel 2013)

Numerosos investigadores han realizado estudios sobre organismos cultivados de intestino de abejas y de colmenas, documentándose una variedad metabólica y actividades funcional (Gilliam and Prest, 1972, 1987; Gilliam and Valentine, 1974; Gilliam et al., 1974; Gilliam, 1978; Evans and Armstrong, 2006).

Sin embargo, la determinación de células normalmente no cultivables contradice con los miembros dominantes de la microbiota del intestino de las abejas, revelando realmente los microorganismos aerobios cultivables comprende solamente una pequeña porción de la diversidad de microorganismos presentes. Una parte de los principales ocho grupos taxonómicos del ambiente del intestino de las abejas son Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Lactobacillales, y Actinomycetes (Ahn et al., 2012;). Estos grupos taxonómicos, corresponden con las definiciones típicas de especies que han sido encontradas en *A. mellifera* alrededor del mundo (Jeyaprakash et al., 2003; Mohr and Tebbe, 2006; Babendreier et al., 2007; Cox-Foster et al., 2007; Martinson et al., 2011; Cornman et al., 2012; Engel et al., 2012; Li et al., 2012; Martinson et al., 2012; Moran et al., 2012; Sabree et al., 2012; Tian et al., 2012). Similares o cercanos a algunos de los grupos taxonómicos han sido encontrado en otras especies de *Apis* en Asia (Ahn et al., 2012; Li et al., 2012) y en muchas especies de abejas bumble (*Bombus*) (Koch and Schmid-Hempel, 2011, 2012; Koch et al., 2012, 2013). En estos estudios se usaron una variedad de metodologías de secuenciación, pero existió similitud en los grupos de microorganismos recuperados.

Las abejas melíferas poseen una alta especificidad de la comunidad microbiota intestinal, componiéndose por alrededor de 8 filotipos específico de microorganismos que no provienen desde el alimento (Martinson et al., 2011; Moran et al., 2012).

Dado la dificultad de discernir entre especies en lo que se refiere a bacterias, cada “grupo” puede representar actualmente uno o más especies. No obstante, estos grupos son válidos ya que consisten en clones filogenéticos bien definidos, y las bacterias dentro de cada clones son encontrados en colaboración con abejas y

no con otros animales o fuentes medioambientales (Martinson Et Al., 2011; Ahn et al., 2012; McFrederick et al., 2012).

Las bacterias de cada uno de estos grupos pueden ser cultivadas en los medios microbiológicos estándares y bajo condiciones correctas de crecimiento. Recientes estudios sobre aislamientos han corroborado los reportes que sustentan el predominio de una microbiota mayoritaria (Olofsson y Vásquez, 2008; Engel et al., 2012; Tian et al., 2012; Vásquez et al., 2012; Kwong y Moran, 2013). Mediante la combinación de cultivos de bajo crecimiento- el análisis de comunidades independientes de bacterias y la fortaleza de las técnicas moleculares disponibles se pueden llegar a un riguroso estudio de la microbiota de las abejas y sus asociaciones.

1.4.3. Géneros predominantes de la microbiota del tracto gastrointestinal de las abejas melíferas.

Género Snodgrassella: Crecen en presencia de CO₂ (5%), a temperatura entre 35-37 °C, pudiéndose cultivar en Triptona Soya Agar y Agar Infusión de Corazón (Kwong and Moran, 2013). Forman colonias aisladas blanquecinas, diámetro de 1mm. en. Son Gram positivos en forma de barra y poco móviles

Género Gilliamella: Tienen condiciones óptimas de crecimiento iguales al Género Snodgrassella, las colonias redondas blancas, 2,5 mm de diámetro. Son Gram positivos en forma de barra y no móviles, puede formar cadenas de filamento. Es negativa para catalasa, reducción de nitrato y oxidasa (Kwong y Moran, 2013).

Género Frischella: Crecen en presencia de CO₂ (5%) o anaerobiosis, a temperatura entre 35-37 °C, en los mismos medios que los géneros anteriores. Es anaerobia facultativa, pero no crece en condiciones completamente aeróbicas (Engel Et Al., 2013). Forma colonias planas, semitransparentes de 1mm diámetro. Las células son en forma de barra y pueden formar filamentos o cadenas. Frischella puede obtener carbón a través de la fermentación de glucosa, fructosa, y manosa. Son Gram negativo, catalasa positiva y negativa para la reducción de nitrato y oxidasa. (Engel et al., 2013).

Género Bifidobacterium: Crecen en atmosferas aeróbica o anaeróbica e temperatura de 37 °C. Pudiendo cultivarse en Agar Sangre y medio MRS

(Bottacini et al. 2012). Bifidobacterium es típicamente anaerobio o microaerófilos; sin embargo, cepas aisladas del intestino de la abeja han mostrado crecimiento en aerobiosis (Bottacini et al. 2012). Las colonias aparecen dentro de 2 días y son puntiformes, abombadas, blanco suave, y pardusco (Biavati et al. 1982). Bifidobacterium de intestino de abejas es catalasa negativa, no forman esporas, son Gram positivos y producen ácido láctico y acético (Olofsson y Vásquez, 2008). **Género Lactobacillus:** Las células del género Lactobacillus puede variar desde largos y delgado bacilos a cortos coco bacilos. (Hammes y Hertel, 2009). Las morfologías de la colonia también varían, pero son típicamente convexas, lisas, opaco y sin pigmento (Hammes y Hertel, 2009). Los Lactobacillus asociados con las abejas son Gram positivos, catalasa negativo, no esporulado y producen ácido láctico por homofermentación (Olofsson y Vásquez, 2008). El *Lactobacillus kunkeei* Clade es fructofílico, utilizando preferentemente fructosa sobre glucosa como fuente de carbón (Neveling Et Al., 2012).

Las especies de Lactobacillus son ubicuas en la naturaleza y son comúnmente encontradas en asociación con muchos animales, plantas y productos alimenticios.

Los Lactobacillus son ampliamente considerado como probiótico, a partir de que su presencia es beneficiosa para la salud del organismo huésped (Kleerebezem y Vaughan, 2009). Los Lactobacillus asociada a las abejas se incluyen en dos clades principales, "Firm-4" y "Firm-5" (Babriendier Et Al., 2007; Martinson et al., 2011; Moran et al., 2012). Estos clades son sólo parientes lejanos de otro Lactobacillus, con identidades de 16S rRNA ~ 90 % (Olofsson y Vásquez, 2008; Vásquez et al., 2012), y así eventualmente pueden ser clasificado como especies nuevas.

Otras especies, *L. kunkeei*, pueden ser la cepa de Lactobacillus más frecuentemente recuperada en experimentos de aislamientos o cultivos (Tajabadi et al., 2011; Vásquez et al., 2012; Neveling et al., 2012). Sin embargo, estudios de cultivos independientes muestran que "Firm-4" y "Firm-5" son los lactobacillus dominantes en el intestino de la abeja, no *L. kunkeei* (Moran et al., 2012; Ahn et al., 2012). *L. kunkeei* también ha sido encontrada en flores (Neveling et al., 2012)

y el vino (Edwards Et Al., 1998), sugiriendo que pueden tener otro hábitat natural fuera del intestino de la abeja (McFrederick Et Al., 2012). Lactobacillus es el grupo más abundante en el intestino de la abeja y - se ha estimado - comprende 20-99 % de bacterias en las obreras individuales (Moran Et Al., 2012).

1.4.3. Evolución y definición del término probiótico

El científico ElieMetchnikoff en el año 1907, evidenció beneficios en el proceso de fermentación de la leche, tras notar que los lactobacilos convertían la lactosa en ácido láctico, por ende la acidez generada creaba un ambiente hostil para las bacterias patógenas. De esta manera, defendió la importancia de la dieta en la salud, tras proveer protección frente a patógenos y así mejorar la calidad de vida.

El médico pediatra francés Henry Tissier, destacó la importancia de las bifidobacterias, al notar la baja cantidad en niños con episodios diarreicos, no así en niños sanos, en quienes encontraba una cantidad significativa, con esta investigación postulo que la administración de bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal.

Lilly y Stilwell en 1965, introdujeron por primera vez el término “probiótico” refiriendo que son “Sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro”.

Parker en 1974 definió a los probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”.

Fuller en 1989 postulo a los probióticos como “suplementos microbianos que influyen beneficiosamente en el huésped animal mejorando su balance microbiano”

Salminen en 1998 posteriormente, conceptualizo a los probióticos como “Alimentos que contienen bacterias vivas las cuales son beneficiosas para la salud”.

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió los probióticos como «Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.

Con la consecuente investigación en torno al tema y teniendo en cuenta los postulados y las definiciones anteriormente enunciadas, se ha ampliado y actualizado el concepto que se tiene de probióticos, como un producto que contiene un número suficiente de microorganismos vivos, puros o mixtos, con un efecto beneficioso sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microbiota por colonización del intestino.

1.4.4. Trabajo con Probióticos en abejas.

En esa línea de trabajo a nivel mundial se viene trabajando en la manipulación de la flora intestinal en diversas especies de animales y más recientemente también en las abejas.

La microbiota del tracto digestivo de las abejas es muy variada y está asociada al tipo de alimentación que tengan las colmenas, el sistema de explotación y la estacionalidad (Rousseau et al.; 1969; Gilliam y Morton, 1978; Gilliam y Prest, 1987; Rada y col., 1997; Mohr y Tebbe, 2006).

La presencia de bacterias ácido lácticas (probióticos) en el tracto digestivo de las abejas melíferas y su vinculación con la salud y producción ha sido menos estudiada que en los animales mayores; resaltan su papel benéfico (Scardovi y Trovatelli, 1969; Rada et al. 1997; Gilliam, 1997; Rada et al., 1997; Jeyaprakash et al.; 2003; Kacaniova et al.; 2004, Babendreier et al.; 2007; Olofsson y Vásquez (2008), Pătruică y Mot 2012, Pătruică et al 2012)

Dentro de los mecanismos de acción más estudiados de los probióticos se mencionan la estimulación del sistema inmune, competencia por la adhesión, producción de sustancias antimicrobianas, y la neutralización de enterotoxinas y sustancias amínicas; acciones que sustentan los resultados benéficos alcanzados en el uso de probióticos en abejas (Vásquez et al.; 2008, Audicio et al.; 2011, Tajabadi et al.; 2013, Chahbar Nora y Mahamed, 2014). Otro de los mecanismos de acción de los probióticos, es su rol en la digestión y absorción de nutrientes (Intriago y Jones ,1993).

En Cuba el sistema de producción apícola se encamina a lograr buenas prácticas zootécnicas y sanitarias en cada punto de la cadena productiva, para mantener colmenas sanas y en equilibrio con el medio donde se desarrollan

(Verde y Chan, 2005, Verde 2014), sin tener que recurrir al uso de productos químicos como los antibióticos como regula el sistema de Control de Salud de Cuba (Resolución 547/2013).

El empleo de probiótico dentro de esta misma línea de trabajo como terapia no farmacológica para la prevención de algunas deficiencias sanitarias de origen microbiano permitiría mantener e incrementar la producción de alimentos de manera sustentable y agroecológica. Los indicadores higiénico-sanitarios se mejorarían en la colonia completa a partir diversos mecanismos de acción de los probióticos; los cuales funcionan como una barrera de defensa profiláctica contra los patógenas de este insecto (Audisio et al.; 2015).

El uso de probióticos en la salud y producción animal en Cuba se ha centrado en su mayoría en estudios sobre animales mayores y menores (bovinos, cerdos, aves, conejos); (Hernández et al 1998, Brizuela et al 2001, García et al 2005a, García et al.; 2008b, Rondón et al.; 2008, Rodríguez et al.; 2009, Piloto et al.; 2010, Ferreira et al.; 2011, Sánchez et al.; 2011a, Milián Grethel et al.; 2013, Rodríguez et al.; 2014, Delgado et al.; 2014, Sánchez y Tromps 2014b, Marin 2010, García Yaneisy y García Yanelys. 2015,) y en menor medida en otras especies (Fonticiella 2005, Sánchez et al.; 2013), pero ninguno de ellos, ha estado vinculado al uso en abejas melíferas.

1.4.5. Probióticos empleados en apicultura

Existe un producto denominado “Lactilli”, elaborado a partir de *Lactobacillus bulgaricus* (70%), *Streptococcus termophilus* (20%), *Lactobacillus acidophilus* (5%) y *Lactobacillus lactis* (5%), que busca, de manera natural y evitando el uso de químicos y antibióticos, inhibir el desarrollo de microorganismos dañinos y fortalecer el sistema inmune de las abejas (Takia, 2011).

En Suecia se emplea un producto llamado Symbeeotic, para mejorar el sistema inmune natural de las abejas, ayudándolas a combatir enfermedades. Los investigadores de la Universidad de Lund, consideran el SymBeeotic, un suplemento natural que contiene bacterias lácticas y que se les da a las abejas como alimento, sobre todo antes y después del invierno.(Anónimo, 2013)²¹

En Argentina se mejora la producción de miel con la aplicación de bacterias probióticas, determinándose que el producto aumenta la población de la colmena, la abeja adulta vive más tiempo y aumento de los rendimientos de miel en las colmenas (Audisio, 2016)

En Chile el Grupo AVanceBiotechnologies Chile S.A. desarrolló el producto A5, biofertilizante compuesto de dos tipos de bacterias probióticas co-dependientes: *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, contenidas en un medio acuoso rico en micronutrientes biodegradables, que pueden ser aplicadas en cualquier tipo de cultivo y dentro de sus propiedades se señala que actúa como un atrayente de abejas y ayuda a delimitar la zona de trabajo para ellas, gracias a la producción *in situ* del L (+) Ácido Láctico (ion biolactato) por parte de los *Lactobacillus* spp. dispersados.

Materiales y métodos de investigación

2.1.1. Delimitación de la Investigación.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spíritus; perteneciente a la Unidad de Laboratorios Centrales de Sanidad Agropecuaria del MINAG, Cuba. Los ensayos se desarrollaron entre los meses de noviembre- abril 2017.

Métodos y técnicas de investigación

2.2.1. Origen de las Cepas

Las cepas utilizadas en los ensayos pertenecían al banco de cepas de *Lactobacillus ssp* del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA) y el Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”. Las cepas fueron aisladas previamente del intestino y estómago de abejas sanas.

2.3.1. Identificación fenotípica.

Observación macroscópica: Se procedió mediante la observación macroscópica de las cepas a describir las propiedades que permitan considerarlas como bacterias ácido lácticas.

Observación Microscópica: A partir de un cultivo de cada cepa en caldo MRS (overnight), se realizará la observación microscópica directa con inmersión (Villarreal 2002). Además, serán valoradas a través de la coloración de Gram y de esporas (Klayraung y col 2008, Mokhbi et al.; 2009).

2.3.2. Tinción de Gram

Objetivo y campo de aplicación

Clasificar las bacterias según su pared celular en Gram positivos y Gram negativos. La tinción de Gram es una tinción diferencial que permite observar la morfología bacteriana.

Método de ensayo

Se extiende una colonia bacteriana sobre un cubreobjetos con una gota de agua y se fija en la llama. Se realiza la tinción con el primer colorante (violeta de genciana) y se deja en contacto 2 minutos. Se lava con agua, eliminando el exceso de colorante. Se añade lugol y se mantiene en contacto durante un 1

minuto. Nuevamente se lava con agua y se trata con alcohol-acetona. Posteriormente se añade safranina durante 1 minuto (colorante de contraste). Se seca a calor suave y se procede a la observación bajo microscopio óptico.

Principio del ensayo

El fundamento radica en las diferencias estructurales de la pared celular de ambos grupos bacterianos. Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano más fina y una capa lipolisacárida externa.

Al añadir alcohol-acetona se arrastrará el colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas queda retenido y las células permanecerán de color violeta.

Las células Gram negativas se teñirán de color rosado por el colorante de contraste utilizado (safranina).

2.3.3. Tinción de esporas

Objetivo y campo de aplicación

Determinar la formación de endosporas por parte de las cepas seleccionadas.

Las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* se caracterizan porque forman endosporas. Las endosporas son formas de resistencia que garantizan la supervivencia del microorganismo en situaciones adversas (agotamiento de nutrientes, cambios de temperatura, acumulación de metabolitos tóxicos, entre otros). Estas estructuras, que contienen una copia completa del genoma, se desarrollan en el interior de la célula bacteriana y cuando la célula muere y se lisa, la endospora queda libre. Las endosporas germinarán cuando las condiciones ambientales sean óptimas. Por el contrario, las cepas de *Lactobacillus* no forman endosporas.

Método de ensayo

Se extiende una porción de una colonia bacteriana sobre una gota de agua en un portaobjetos y se fija a la llama. Se coloca un papel de filtro sobre la muestra y se sujeta con una pinza. Se empapa el papel con verde malaquita y se pasa por encima de la llama del mechero bunsen para que haya emisión de vapores.

Cuando éstos se dejen de emitir se vuelven a pasar las muestras por encima de la llama, volviendo a empapar el papel con colorante si es necesario.

Se retira el papel y se lava con agua. Seguidamente se añade safranina (colorante de contraste) durante medio minuto. Se retira el exceso de colorante con agua y se seca con calor suave.

Principio del ensayo

Las cepas del género de *Lactobacillus* no forman endosporas.

2.4. A partir de los cultivos puros se realizarán las siguientes pruebas:

2.4.1. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La capacidad de las cepas para producir H₂O₂ se determinó siguiendo la metodología descrita por McLean y Rosenstein (2000). Los cultivos bacterianos se sembraron por estría sobre 15 ml de agar MRS suplementado con 2,5 mg/ml de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma) y 0,01 mg/ml de Peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. Luego de ese período de incubación, las placas fueron abiertas y expuestas al aire atmosférico durante 30 min bajo flujo laminar. Las colonias de las cepas productoras de H₂O₂ virarán al color azul. En presencia de H₂O₂ la enzima HRP oxida al TMB (inoloro) para dar lugar a la formación de un pigmento azul. La tonalidad de la coloración azul se considera una medida semicuantitativa de la cantidad de H₂O₂ producido y liberado al medio por la cepa (Rosenstein et al., 1997). La tonalidad de la coloración azul será incluida dentro de una de las siguientes categorías: azul claro o azul oscuro.

2.4.2. Hidrolisis de la caseína de la leche (proteólisis).

Para examinar la actividad proteasa se utilizó la metodología descrita por Harrigan (1998) con algunas modificaciones. Se prepararon dos medios de cultivo: Medio 1: agar leche descremada, que consiste en leche en polvo descremada al 5% y agar agar al 1,3% (Britania)

Medio 2: agar-leche que se prepararon de la siguiente manera, por un lado se disuelve leche en polvo descremada al 2% en agua destilada y por otro agar agar (Britania) a una concentración del 1,3 %; se esterilizarán por separado la leche y el

agar agar, se dejarán enfriar a 60 °C y luego serán mezclados y dispensados en placas de Petri.

Para el desarrollo del ensayo se prepararon placas con perforaciones de 6 mm de diámetro que fueron rellenas con 20 µl de cultivos y placas sin perforaciones que se sembraron por estrías. Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control. Todas las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. La presencia de halo transparente alrededor de las colonias (siembra mediante estrías) y pocillos (placas con medios perforados), se consideró como reacción positiva de proteólisis de la caseína. El ensayo se realizó por triplicado.

2.4.3 Prueba de coagulación.

Se utilizó leche descremada en polvo con una concentración final de sólidos de 12,5 %. Posteriormente fue dispensada en tubos de ensayos de 15 mL de capacidad, a razón de 9 mL, los cuales se esterilizaron en vapor fluente durante 20 min. Se dejó enfriar a 45°C y se le añadió 1 mL (10% vol/vol) del inóculo inicial (crecido de 16 – 18 horas en MRS, pH 6,5). Los tubos se incubaron a 37°C durante 12 horas. La coagulación de la leche se consideró positiva cuando apareció la presencia de un coagulo adherido al fondo del tubo que no se desplaza al invertir el mismo. Se utilizó *Lactobacillus acidophilus* como control positivo. El ensayo se realizó por triplicado.

2.4.4. Actividad hemolítica.

La prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) fue montada sobre Agar Columbia suplementado con 5 % vol/vol de sangre equina para observar la actividad hemolítica según Peres et al.; (2014) y Begum et al.; (2015). Los cultivos frescos fueron sembrados por estrías en el medio distribuido en placa e incubado a 37 °C durante 24 h. Los microorganismos que mostraron en las placas halos de hemólisis alrededor de las colonias se consideraron positivos. Se utilizará como control positivo la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.4.5. Crecimiento a diferentes temperaturas.

Se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL de capacidad, con 9 mL de MRS a pH 6,5 a los que se le inoculo 1 mL (10% vol/vol) de cultivo fresco (16 h en MRS, pH 6,5) y se incubaron a diferentes temperaturas (37 y 45 °C) durante 24 h,

mediéndose el crecimiento (Ávila J et al.; (2010). Se evidenciará el crecimiento por cambios de turbidez.

2.4.6. Prueba de Inhibición de las BAL frente a *Paenibacillus larvae*. Técnica de mota en césped (spot on the lawn).

Para la técnica de mota en césped (Lewus y Montville, 1991, Zamora, 2003), fueron utilizados cultivos *overnight* de las BAL. Se prepararon placas de medio MRS sólido sobre las cuales serán sembrados 10 µL de cada cultivo activo de las cepas en estudio. Las placas fueron dispuestas bajo flujo laminar durante 30 min para permitir la absorción del cultivo y posteriormente se incubaron en estufa a 37°C durante 24 horas en aerobiosis. Luego se inocularon 10 mL de agar BHI fundidos con 40 µL de un cultivo fresco de *Paenibacillus larvae*. El agar con el patógeno (*P. larvae*) en suspensión fue utilizado para cubrir las placas con las cepas en evaluación, incubándose nuevamente las placas a 37 °C durante 24 h. Las placas serán observadas en busca de presencia o ausencia de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano. Como medida cualitativa se utilizará la escala siguiente:

1. Cepa no inhibidora: No presenta halo de inhibición.
2. Cepa poco inhibidora: Presenta halo menor o igual a 10 mm.
3. Cepa fuertemente inhibidora: Presenta halo mayor de 10 mm.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1.1. Identificación fenotípica.

Todas las cepas fueron compatibles con la morfología de las bacterias ácido lácticas tipo *Lactobacillus*, bacilos Gram positivos, no esporulados cortos, en algunos casos curvos y todos catalasa negativos. De esta manera las 5 cepas correspondieron con los criterios morfológicos y bioquímicos que presenta el género *Lactobacillus*.

Los microorganismos aislados fueron capaces de crecer en los medios selectivos utilizados para lactobacilos, morfológicamente predominaron bacilos, cocobacilos y cocos; todos Gram positivos, catalasa negativos y capaces de crecer en condiciones de microaerofilia; estos gérmenes se corresponden con los reportados por Rada *et al.* (1997), sin embargo Kacaniova *et al* (2004) en su estudio no observó lactobacilos. La morfología de las cepas de BAL son similares a las descritas para estas especies por Mejía y col. (2007) y Sánchez y col (2011).

Tabla 1. Morfología de las BAL en el Medio MRS (24 h de incubación).

Cepas	Reacción de Gram	Morfología
<i>Fructobacillus fructosus</i> (66)	+	Cocobacilos en cadenas cortas
<i>Lactobacillus kunkeei</i> (70)	+	Bacilos de cadenas cortas
<i>Fructobacillus fructosus</i> (72)	+	Cocobacilos en cadenas cortas y cocos bacilos sueltos
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (73)	+	Bacilos en cadenas cortas
<i>Lactococcus garvieae</i> (79)	+	Cocobacilos en cadenas cortas y cocos bacilos sueltos

3.2.1. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

En la tabla 2 se muestra que el 80 % de las cepas resultaron positivas a la prueba de producción de peróxido de hidrógeno. Los mecanismos y la eficacia del efecto probiótico depende de la interacción con la microbiota del huésped y factores inmunológicos (Guarner y Malagelada, 2003).

El 80 % de las cepas de estudio resultaron positiva al ensayo de producción de peróxido de hidrógeno. Dentro de los criterios a tener en cuenta en la evaluación de los probióticos se incluye la producción de H₂O₂ por constituir factor inhibidor del crecimiento o colonización del intestino por agentes patógenos potenciales (Saad y col 2013, Iranmanesha y col 2014).

Tabla 2. Producción de peróxido por las cepas evaluadas.

Cepas	Rapidez de aparición	Tonalidad	Resultado
<i>F. fructosus</i>	+++	Azul oscuro	Positiva
<i>F. fructosus</i>	++	Azul claro	Positiva
<i>L. garvieae</i>	+++	Azul oscuro	Positiva
<i>Weissella paramesenteroides</i>	++	Azul claro	Positiva
<i>L. kunkeei</i>	-		Negativo
<i>W. paramesenteroides</i>	+++	Azul oscuro	Positiva
<i>L. kunkeei</i>	++	Azul claro	Positiva
<i>F. fructosus</i>	+++	Azul oscuro	Positiva

3.2.5. Crecimiento a diferentes temperaturas.

Las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a 37⁰C, con crecimiento abundante *Fructobacillus fructosus* (72), *Lactobacillus rhamnosus* (73) y *Lactococcus garvieae* (79); mientras que a 45⁰C únicamente creció abundante *Fructobacillus fructosus* (72) y *Lactobacillus rhamnosus* (73).

3.2.2. Hidrolisis de la caseína de la leche (proteólisis).

Solo se apreció hidrólisis de la caseína a las 48 h en *Fructobacillus fructosus* (72). El ensayo cualitativo de proteólisis fue interpretado por la formación de halo

alrededor de las colonias, las cuales crecieron sobre el medio de leche descremada en polvo. Las BAL no mostraron actividad proteolítica, correspondiendo con lo planteado por Peres Cátia (2014) quien reportó cepas que exhibían baja actividad de la enzima. La variación encontrada entre cepas puede estar dada por componentes de la pared celular o del medio en que se desarrollan las cepas (Matthews y col 2004).

La actividad proteolítica de las cepas es un indicador a tener en cuenta para evaluar la actividad probiótica de las cepas, específicamente referente a la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se generan durante la fermentación del alimento o en el proceso de la digestión (Pelaez y Requena, 2005). Estos péptidos bioactivos incluyen algunas secuencias de aminoácido que ejercen una actividad biológica específica en el huésped (Aimutis, 2004).

La industria alimentaria usa bacterias proteolíticas capaces de hidrolizar proteínas de la leche como la caseína. Enzimas como la aminopeptidasa son la clave para que estos organismos sean utilizados como iniciadores debido a que los exopolisacáridos creados por estas peptidasas son indispensables para generar una textura y propiedades organolépticas favorables para los productos (Fernandez-Espla y Rul, 1999).

No obstante, este es otro indicador de seguridad en la evaluación de cepas candidatas a probióticos (Ruiz-Moyano y col 2009), partiendo de que altas concentraciones de aminos en los alimentos son responsables de varios problemas toxicológicos (Mariné-Font y col 1995, Ammor & Mayo, 2007).

Tabla 3. Temperatura de crecimiento y hidrólisis de la caseína de las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*).

Cepas	Temperatura de crecimiento		Hidrólisis de la caseína (mm)*	
	37 ⁰ C	45 ⁰ C	24 h	48 h
<i>F. fructosus</i> (66)	+	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> (70)	++	-	-	-
<i>F. fructosus</i> (72)	+++	+++	-	20
<i>L.rhamnosus</i> (73)	+++	+++	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> (79)	+++	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Control positivo)	NA	NA	18	45

Referencias: - Ausencia de crecimiento; +Crecimiento muy débil; ++ Crecimiento débil; +++ Crecimiento abundante. NA: no aplica.

* Diámetro del halo de proteólisis.

3.2.3 Prueba de coagulación.

De las cepas objeto de evaluación (tabla 4) se comprobó que solo *Fructobacillus fructosus* (66) fue negativa a la prueba de coagulación en todos los tiempos, al compararlas con la cepa patrón *L. acidophilus*. No mostrando ningún tipo de hemólisis *Fructobacillus fructosus* (72)

La coagulación consiste en una serie de modificaciones fisicoquímicas de la caseína (proteína de la leche), que conducen a la formación de un coágulo. La coagulación láctica o ácida es realizada por las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o procedente del fermento, que transforman la lactosa en ácido láctico haciendo descender el pH de la leche, lo que produce la alteración de la caseína hasta la formación de un coágulo (O’Keeffe et al., 1975).

La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de lactosa en condiciones ácidas produce un coágulo firme y gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo, comportamiento observado en la prueba por todas las cepas excepto *Fructobacillus fructosus* (66). Este constituye un importante

indicador para nuestras condiciones al permitir mantener la cepa en un medio natural y obtener masa bacteriana.

3.2.4. Actividad hemolítica.

Dentro de los indicadores recomendados por la FAO/WHO (2002) para evaluar los probióticos, la actividad hemolítica es uno de los criterios de selección dada su relación con la virulencia de las cepas (de Vuyst, Foulquie, & Revets, 2003). Ninguna de las cepas evaluadas en nuestro trabajo reveló fuerte actividad hemolítica con excepción de *Fructobacillus fructosus* (66). Estos resultados se corresponden con los encontrados por Kalui y col (2009), Mami y col (2008), quienes reportaron en estudios de BAL actividad hemolítica negativa, mientras que Ruiz-Moyano (2009) encontró cepas de *L. casei* hemólisis positiva.

Tabla 4. Prueba de la coagulación de la leche y actividad hemolítica de las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*).

Cepas	Prueba de la coagulación de la leche*			Actividad hemolítica a las 72 h
	24 h	48 h	72 h	
<i>F. fructosus</i> (66)	-	-	-	+ (β)
<i>L. kunkeei</i> (70)	-	-	+	+ (α)
<i>F. fructosus</i> (72)	+	+	+	-
<i>L. rhamnosus</i> (73)	+	+	+	+ (α)
<i>Lactococcus garvieae</i> (79)	-	-	+	+ (α)
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	

*Referencias: - Ausencia de crecimiento; + Presencia de crecimiento (coagulación de la leche).

3.2.6. Prueba de Inhibición de las BAL frente a *Paenibacillus larvae*.

De todas las cepas evaluadas se pudo observar que *Fructobacillus fructosus* (66), en ninguno de los tiempos y técnicas mostró inhibición frente a *Paenibacillus larvae* y *Lactobacillus kunkeei* (70) solo lo hizo en la técnica de Spot.

La producción de sustancias inhibitoras ha sido reportadas para todo el género de lactobacillus, incluyendo a Lactococcus, Estreptococo, Lactobacillus, Leuconstoc y Pediococcus, así como Enterococcus (Iranmanesha, 2014). En el estudio todas las cepas produjeron inhibición en alguna de las técnicas, excepto *Fructobacillus fructosus* (66), lo que demuestra la interacción de factores con efecto inhibitor sobre *Paenibacillus larvae* (Servin, L. A. 2004).

Sánchez y col (2014) en trabajo de caracterización, mediante pruebas in vitro, de cepas BAL procedentes de fuente animal para considerar su posterior aplicación como probiótico en animales encontró que la mayoría de las cepas evaluadas exhibieron actividad antagónica contra la totalidad de los patógenos *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*.

En relación a la naturaleza de esta flora, el estudio de Audisio y Apella 2006, por medio de aislamientos directos del intestino de varias abejas, demuestra la presencia de al menos 100 cepas diferentes de lactobacilos capaces de inhibir fuertemente el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Staphilococcusniger*, *Listeria* y *Paenibacillus larvae*. Estos resultados indican que Lactobacillus es un constituyente de la microbiota intestinal de la abeja melífera y que es posible la formulación de un suplemento probiótico capaz de inhibir al *Paenibacillus larvae* en la protección contra la loque americana. (Audisio y Apella, 2006).

No obstante, no se tiene un completo análisis de la naturaleza de las sustancias antagónicas que producen las cepas evaluadas. Se describe por varios autores que en esta actividad pueden estar presentes ácidos orgánicos (tales como ácido láctico), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas (Rodríguez, 2009, Iranmanesha y col 2014, Jurado-Gómez y col 2014).

Como se ha podido ver, son muchas las exigencias que debe satisfacer la miel para poder ser exportada, entre las más importantes figura la ausencia de residuos de antibióticos y pesticidas. Es por ello que el uso de probióticos y otros productos naturales inocuos adquieren gran importancia en el tratamiento y prevención de las más importantes enfermedades de las abejas. El uso de probióticos en apicultura no es una práctica muy común, sin embargo, mediante la

inclusión de bacterias ácido lácticas en la dieta, es posible, por efectos de exclusión competitiva, disminuir la carga de microorganismos patógenos y prevenir los efectos negativos que éstos presentan en la producción.

Tabla 5. Prueba de Inhibición de las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*) frente a *Paenibacillus larvae*.

Cepas	Diámetro del halo de inhibición (mm) - Técnica Spot		Diámetro del halo de inhibición (mm) - Técnica estría	
	24h	72h	24h	72h
	<i>F. fructosus</i> (66)	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> (70)	15	15	-	-
<i>L. rhamnosus</i> (73)	12	12	27	27
<i>Lactococcus garvieae</i> (79)	4	4	13	13
<i>F. fructosus</i> (72)	5	5	13	13

Conclusiones.

- ❖ Se pudo apreciar que todas las cepas fueron compatibles con los criterios morfológicos y bioquímicos de las bacterias ácido lácticas tipo *Lactobacillus* aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*).
- ❖ El 80 % de las cepas resultaron positivas a la prueba de producción de peróxido de hidrogeno, crecieron a 37⁰C, no hidrolizaron la caseína a las 24 horas, ni produjeron hemólisis con excepción de *Fructobacillus fructosus* (66).
- ❖ De todas las cepas evaluadas se pudo observar que *Fructobacillus fructosus* (66), en ninguno de los tiempos y técnicas mostró inhibición frente a *Paenibacillus larvae*, el *Lactobacillus kunkeei* (70) solo lo hizo en la técnica de Spot y las restantes cepas mostraron inhibición en todos los tiempos y técnicas.

Recomendaciones.

Ampliar los estudios de las cepas con ensayos de antagonismo y resistencia a antibióticos.

Continuar los estudios de viabilidad de las cepas que mejor comportamiento mostraron en medios artificiales de las abejas.

Bibliografía

- ACPA. Asociación Cubana de Producción Animal. Finquero. Fincas Diversificadas. Ed. ACPA. Cuba. p. 63-69. 2010
- AHN, J H; HONG, I P; BOK, J I; KIM, B Y; SONG, J; WEON, H Y (2012) Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. Journal of Microbiology 50(5): 735-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-2188-0>.
- Aimutis, W. R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. Journal of Nutrition, 134, 989S-995S.
- APITRACK. "EE.UU. Las abejas son más numerosas que los mamíferos y los pájaros combinados". Noticias 175.
Disponibile:<http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/bee-census-47061205>. 2008
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. Microbiol Res 1:1–13. (2011).
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. Bee-gut. Microbiol Res 166:1–13. (2011).
- Audisio, M. Carina; Sabaté, Daniela C. Benitez-Ahrendts, Marcelo R. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L bee-gut,

exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*, vol. 2 p. 29 – 29. 2011.

- Audisio, M. Carina; Sabaté, Daniela C; Benitez-Ahrendts, Marcelo R. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* I bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*, vol. 2 p. 29 – 29. 2011.
- Audisio, M.C. and Benítez-Ahrendts, M.R., *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes* 2: 29-34. 2011.
- BABENDREIER, D; JOLLER, D; ROMEIS, J; BIGLER, F; WIDMER, F (2007) Bacterial community structures in honey bee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology* 59(3): 600–610.
- Barnett, E.A., Charlton, A.J. and Fletcher, M.R. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. *Pest Management Science* 63: 1051-1057. 2007.
- Begum S.B. Roobia, R. R. Karthikeyan M., Murugappanet R.M. (2015). Validation of nutraceutical properties of honey and probiotic potential of its innate microflora / *LWT - Food Science and Technology* 60, 743-750
- Bottacini F, Milani C, Turrone F, Sánchez B, Foroni E, Duranti S, Serafini F, Viappiani A, Strati F, Ferrarini A, Delledonne M, Henrissat B, Coutinho P, Fitzgerald GF, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS One* 7(9):e44229. doi:10.1371/journal.pone.0044229. (2012).
- *Bradbear, N. 2005 La apicultura y los medios sostenible. Organización de las naciones unidad pada la agricultura y la alimentación FAO.*
- Calatayud, F. y E. Simó Zaragoza. Importancia de las abejas melíferas y otros insectos como agentes polinizadores de las plantas cultivadas y silvestres de la comunidad valenciana. *Apis cervices*.

- Carpana, E. L'Aperegina. Allevamento e Selezione. IL Genere Apis: Evoluzione e Biogeografia. Parte 1. En: Genética. Capítulo 1. Istituto Nazionale di Apicoltura Bologna. Italia. p. 23-89. 2004.
- Chahbar Nora; Mahamed A.L. Contribution to identification of the microflora of the digestive tract and pollen of Algerian honeybees: *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* .3(6) 601-607. (2014).
- Demedio, J. L., Sanabria J. L., Leal, A., Lóriga, W. & Fonte, L. Polinización apícola: una invitación a los agricultores. *Revista CEDAR. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Cuba.* (2011).
- Engel, P; James, R; Koga, R; Kwong, W K; McFrederick, Q S; Moran, N. A Standard method for research on *Apis mellifera* gut symbionts. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Ends) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research. Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>. (2013)
- Engel, P; Partinson, V; Moran, N A (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honeybee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(27): 11002-11007.
- Evans J. D., K. Aronstein, Y. P. Chen, C. Hetru, J. L. Imler, H. Jiang, M. Kanost, G. J. Thompson, Z. Zou, D. Hultmark (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15: 645-656.
- Evans J. D., Armstrong T.-N.: Antagonistic interactions between honeybee bacterial symbionts and implication for disease. *BMC Ecology*, 6, 4. 11. 2006.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D.: Immune pathways and defence mechanisms in honeybees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15, 645-656. 2006.

- Evans, J.D. and Schwarz, R.S. Bees brought to their knees: microbes affecting honeybee health. *Trends in Microbiology* 19: 614-620. 2011
- Evans, J.D. Diverse origins of tetracycline resistance in the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 46-50. 2003.
- *FAO, 2005. Protección a los polinizadores. Publicado en Revista FAO, Diciembre.*
- FAO/WHO. (2002). Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Available at <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Fernandez-Espla, M. Rul, F. (1999). PepS from *Streptococcus thermophilus*: A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 263: 502 -510.
- García C. Yanelys, García Yaneisy, López Anahí y Boucourt R. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 39, No. 2. (2005).
- García Yaneisy H., García Yanelys C. Uso de aditivos en la alimentación animal: 50 años de experiencia en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 49, Número 2. 173. 2015.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511. 2006.
- Gilliam M, Morton HL .Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honeybees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-d and antibiotics. *Apidologie* 9:213–222. (1978).
- Gilliam M, Prest D B. Microbiology of the larval honeybee, *Apis mellifera*. *J Invert Pathol*; 49: 70–5. 1987
- Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honeybees. *FEMS Microbiol Lett*; 155:1–10. (1997).

- HAMMES, W P; HERTEL, C (2009) Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212 AL. In P De Vos; G M Garrity; D Jones; N R Krieg; W Ludwig; F A Rainey; K Schleifer; W B Whitman (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd Ed.). Vol. 3, The Firmicutes. Springer; New York, USA. pag 465–490.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. and Martín-Hernández, R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology* 5: 17-29. 2013
- Iranmanesha M. Ezzatpanah H. Mojgani N. (2014). Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT - Food Science and Technology* 58: 355-359.
- Jeyaprakash A., Hoy M.A., Allsopp M.H. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences, *J. Invertebr. Pathol.* 84, 96–103. (2003).
- Jurado-Gómez H. Martínez J. A., Chaspuengal Aura Magdalena, Calpa F. Y. (2014). Evaluación in vitro de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 12 No. 2* (49-59)
- Kacaniova M, Chlebo R, Kopernichy´ M, Trakocvicka A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol*; 49:169–71.
- Kalui, C. M., Mathara, J. M., Kutima, P. M., Kiiyukia, C., & Wongo, L. E. (2009). Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *African Journal of Biotechnology*, 8, 4363-4373.
- Klayraung, S; Okonogi, S; Viernstein, H. (2008). Comparative Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from Thai Traditional Fermented Foods: Miang and Nham. *Research Journal of Biological Sciences* 3(9): 1119-1124.
- KLEEREBEZEM, M; VAUGHAN, E E (2009) Probiotic and gutlactobacilli and bifidobacteria: molecular approachesto study diversity and activity.

Annual Review of Microbiology 63: 269-290.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>.

- Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., Lebuhn, G. and Minckley, R. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land use change. *Ecology Letters* 10: 299-314. 2007
- KWONG, W K; MORAN, N A (2013) Cultivation and characterization of the gut symbionts of honeybees and bumblebees: *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the Neisseriaceae family of the Betaproteobacteria; and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbalesord. nov., a sister taxon to the Enterobacteriales order of the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,
- Lavine M. D., M. R. Strand (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295-1309.
- Mami, A., Henni, J. E., & Kihal, M. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Science*, 3, 39-49
- Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit Contam* 23:265–273. (2006).
- MARTINSON, V G; DANFORTH, B N; MINCKLEY, R L; RUEPPELL, O; TINGEK, S; MORAN, N A (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honeybees and bumblebees. *Molecular Ecology* 20(3): 619-628. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>
- MARTINSON, V G; MOY, J; MORAN, N A (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology* 78(8): 2830–2840. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07810-11>

- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., & Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5715-5731.
- MCFREDERICK, Q S; CANNONE, J J; GUTELL, R R; KELLNER, K; PLOWES, R M; MUELLER, U G (2013) Host specificity between Hymenoptera and Lactobacilli: the exception rather than the rule. *Applied and Environmental Microbiology* 79(6): 1803-1812.
- MCFREDERICK, Q S; WCISLO, W T; TAYLOR, D R; ISHAK, H D; DOWD, S E; MUELLER, U G (2012) Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Molecular Ecology* 21(7): 1754-1768. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x>
- Mejía, J; Chacón, Z; Guerrero, B; Otoniel, J y López, G. (2007). Obtención de Cepas de *Lactobacillus*. Caracterización in-vitro como potenciales probióticas. *Revista científica FCV-LUZ/ Vol. XVII, Nº 2*, 178-185.
- Milián Grethel, Rondón A.J., Pérez M., Bocourt R., Rodríguez Z., Ranilla M.J. Rodríguez M. 1 y Carro M.D. Evaluación de biopreparados de *Bacillus subtilis* como promotores del crecimiento en pollos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 47, Número 1, 61. (2013).
- MINAG, Resolución 547/2013.
- Miyagi, T., Peng, C.Y.S., Chuang, R.Y., Mussen, E.C., Spivak, M.S. and Doi, R.H. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 95-96. 2000.
- Mohr KI, Tebbe. C.C. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Env Microbiol* 8:258–272. (2006)
- Mokhbi, A; Kaid-Harche, M; Lamri, K. (2009). Selection of *Lactobacillus plantarum* strains for their use as starter cultures in Algerian olive fermentations. *Grasas y Aceites. Departement des Sciences Agronomiques* 60(1): 82-88.

- MORAN, N A; HANSEN, A K; POWELL, J E; SABREE, Z L (2012) Distinctive gut microbiota of honeybees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One 7(4): e36393. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036393>
- Morse, R.A., Calderone, N.W. The value of honey bee pollination in the United States Bee Culture 128, 1–15. 2000.
- Natalichio, R. La biodiversidad del planeta, en juego. ECOPORTAL. Disponible en: www.ecoport.net. Consultado [05/23/2008]. 2008.
- Nava GM, Davila V. Nuevas perspectivas en la selección y evaluación de probióticos. Revista Chilena de nutrición. Vol. 21, Suplemento N° 1, Noviembre. p-184-185. (2004).
- NEVELING, D P; ENDO, A; DICKS, L M (2012) Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and beehives. Current Microbiology 65(5): 507-15. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-012-0186-4>
- OLOFSSON, T C; VÁSQUEZ, A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honeys to match of the honeybee *Apis mellifera*. Current Microbiology 57(4): 356-363. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0>
- Padilla F. A., Flores Serrano J. M. y Campano F. C.. (2009). La defensa de las abejas frente a la enfermedad. El Colmenar. nº 95 julio-septiembre.
- Pătruică S, Mot D the effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal Microflora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). Bull Entomol Res 102:619–623. (2012)
- Pelaez, C., Requena, T. (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. International Dairy Journal, 15, 831-844.
- Peres Cátia M., Alves Marta, Hernandez-Mendoza A. Moreira Liliana, Silva Sandra, Bronze Maria R. Vilas-Boas Luís, Peres Cidália, Malcata X. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. LWT - Food Science and Technology 59,234-246.

- Pesante, D. 2010. Anatomía de la abeja (en línea). Consultado 10 ene. 2012.
Disponible en <http://academic.uprm.edu/dpesante/4016/03-anato.PDF>
- Rada V, Máchová M, Huk J, Marounek M, Duskova B. Microflora in the honeybee digestive tract: count, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie* 1997;28:357–65.
- Rodríguez J.C., Carmenate María del Carmen, Hernández J.E., Guerra A., Calero I., Álvarez J.M., Martín E. y Suárez Madeleine .Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos en crecimiento. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. Volumen 16 (número 1). 54-58. (2009).
- Rodríguez, D; Rocha, T, Gómez, A; Goodfellow, B; Freitas, A. Lipolysis in probiotic and symbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry* 131: 1414-1421. 2012.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S96-S119. 2010.
- Ruiz-Moyano S. Martín A. Benito María J. Casquete R. Serradilla M. J. Córdoba María de Guía (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages *Meat Science* 83, 460–467.
- Saad N., Delattre C. Urdaci M. Schmitter J.M. Bressollier P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* 50 (2013) 1-16
- Sánchez, L., Vichi, J., Llanes, M., Castro, E., Soler, D. M., Espinosa, I., & Ferreira, C. L. (2011). Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp como candidato a probióticas. *Revista de Salud Animal*, 33(3), 154-160
- Sanidad apícola, colectivo de autores, 2002.

- Scardovi V., Trovatelli L.D. New species of bifid bacteria from *Apis mellifera* L. And *Apis indica* F.A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*, Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 123, 64–88. (1969).
- Servin, L. A. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28,405-440.
- Tajabadi, N; Mardan, M; Abdul Manap, M Y; Shuhaimi, M; Meimandipour, A; nateghi, L (2011) Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honey bee *Apis dorsata*. *Apidologie* 42(5): 642-649. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0069-x>
- Tian, B.Y., Fadhil, N.H., Powell, J.E., Kwong, W.K., Moran, N.A. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *Microbiology* 3(6), e00377–00312 Google Scholar. (2012)
- TIAN, B; FADHIL, N H; POWELL, J E; KWONG, W K; MORAN, N A. (2012) Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *M Bio* 3(6): e00377-12. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00377-12>
- Vásquez, A; Forsgren, E; Fries, I; Paxton, R J; Flaberg, E; Szekely, L; Olofsson, T C (2012) Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PloS One*. 7(3):e33188.
- Verde Mayda M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 48, Número 1, 2014. 25. (2014).
- Verde Mayda M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 48, Número 1, 2014. 25. (2014).
- Verde Mayda, Chan V. S. Estrategia de lucha integrada para el control de varroa: Resultados y experiencia cubana. Octubre/2005 – Consultada Mayo 2015 .*Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* .ISSN 1695-750. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Vol. VI, N° 10. 2005.
- Verde, M. Curso de actualización de apicultura. Conferencia técnica. Consejo Científico Veterinario de Cuba. Digital. 2010.

- Verde, M. y col. Polinización y polinizadores. Guión para la televisión cubana. Programa “De sol a sol”. Empresa comercializadora CAGUAX. Ministerio de la Agricultura. Cuba. 2013.
- Verde, M., Gómez, T. & Demedio, J. Salud apícola. Tomo I. Generalidades. Ed. Consejo Científico Veterinario. p. 57-73. 2012.
- Vuyst, L., Foulquie, M. R., & Revets, H. (2003). Screening for entrains and detection of hemolysis and vancomycin resistance in Enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 299-318.
- Wilson-Rich N., S. T. Dres, P. T. Starks. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1392-1399. (2008)
- Yangari, B. El ocaso de las abejas alarma a los científicos. Ed. CENSA. Red de Desastres: redesastres@censa.edu.cu Cuba. Circulado por: Abeledo, G. <abeledo@censa.edu.cu> Infomed. Cuba. Fecha: 13 de mayo, 14:59:15 -0500. 2008.
- Zamora M.L. (2003). Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Tesis doctoral. Universidad de Gir
-