



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS  
"JOSÉ MARTÍ PÉREZ"  
FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA



# TRABAJO DE DIPLOMA

**"EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE *LACTOBACILLUS* SSP. SOBRE INDICADORES DE SALUD EN COLONIAS DE ABEJAS *APIS MELLÍFERA*"**



**Autora: Yossys Cepeda Yanes.**

**Sancti Spíritus, 2018**



UNIVERSIDAD DE SANCTI SPÍRITUS  
"JOSÉ MARTÍ PÉREZ"  
FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA



# TRABAJO DE DIPLOMA

**"EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LACTOBACILLUS SSP.SOBRE INDICADORES DE SALUD EN COLONIAS DE ABEJAS APIS MELLÍFERA"**

**Autora: Yossys Cepeda Yanes.**

***Tutor: Dr.C. Juan Emilio Hernández García.  
Dr. M.V. José Antonio Rodríguez Díaz.***

**Curso: 2017-2018**

**"Año 59 de la Revolución"**

*Pensamiento:*

*“Sin abejas no hay polinización, no hay agricultura, no hay alimentos, no hay animales, no hay humanos”*

*Einstein*

## **Agradecimientos:**

*A mis padres Nancy y Modesto, por su esfuerzo y dedicación que me brindaron en la buena formación de mi persona, por brindarme una carrera para mi futuro y por siempre creer en mí.*

*A mi esposo José Antonio por todo su amor, cariño durante este tiempo, y por brindarme su comprensión en todo momento.*

*A mis profesores y amistades muy cercanas por haberme apoyado de alguna manera en la culminación de mis estudios del presente trabajo de investigación.*

*Al Dr.C. Juan Emilio Hernández García y el Dr. M.V José Antonio Rodríguez, por haberme brindado su asesoría y haber compartido sus conocimientos durante el desarrollo de la presente investigación.*

*Al Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), que a través de sus laboratorios y personal técnico me permitieron realizar la preparación de muestras para la ejecución de la investigación.*

*A todos muchas gracias*

## Contenido

Introducción:.....	1
Problema científico.....	3
Hipótesis: .....	3
Objetivo general: .....	4
Objetivos específicos.....	4
I.    Revisión bibliográfica.....	5
1.1.    La importancia de las abejas.....	5
1.2.    Polinización.....	7
1.3.    Patógenos que afectan a las abejas.....	7
1.3.1.    Patógenos de cría.....	8
1.3.2.    Nosema apisand y Nosema ceranae.....	9
1.3.3.    Espiroplasmosis.....	10
1.3.4.    Varroa destructor.....	10
1.4.    Composición de la microbiota intestinal de las abejas. Importancia.....	11
1.4.1.    Composición de la microbiota del intestino de las abejas.....	11
1.5.    Alimentación artificial de las abejas.....	13
1.5.1.    Alimentación artificial.....	13
1.5.2.    Jarabe de azúcar.....	14
1.5.3.    Azúcar morena.....	14
1.6.    Probiótico.....	15
1.7.    Aplicación de microorganismos benéficos en las abejas.....	16
1.7.1.    Aplicación de Microorganismos Beneficiosos.....	16
II.    METODOS Y TECNICAS DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
2.1.    Trabajo de laboratorio.....	21
2.1.1.    Cepas.....	21
2.1.2.    Crecimiento de las cepas en alimento artificial (jarabe).....	21

2.2. Trabajo de Campo.....	22
2.2.1. Ubicación de los ensayos. ....	22
2.2.2. Administración de las cepas y conformación de los grupos.....	22
2.2.3. Esquema de administración de las cepas:.....	24
2.2.4. Comportamiento de las colonias.....	24
2.3. Análisis estadístico. ....	25
III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
Conclusiones.....	35
Recomendaciones: .....	36
Bibliografía: .....	37
Anexos.....	46

## **Síntesis:**

La investigación se llevó a cabo en un apiario docente- experimental (LARISA), entre los meses de marzo-junio, 2018 y tuvo como objetivo comprobar el efecto probiótico del jarabe inoculado con cepas de *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 sobre indicadores de salud en colonias de abejas *Apis mellífera*. El diseño experimental incluyó 2 grupos problemas y 1 testigo, representando concentraciones de sacarosa diferentes, (125 g/L y 50% v/v). Se evaluó inicialmente el crecimiento de las cepas empleadas en un medio de cultivo alternativo. En el experimento de campo se evaluó al inicio y al final de la etapa (28 días) los siguientes indicadores: consumo del jarabe inoculado por colmena, tasa de infestación de las principales enfermedades y fortalezas de las colmenas. No se encontró diferencias significativas del crecimiento de las cepas entre los medios convencional-MRS y el alternativo-MISSEL. Los resultados de campo mostraron que, en el nivel de consumo de jarabe, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, demostrándose que el inóculo no influye en la palatabilidad del jarabe. En el diagnóstico inicial de las enfermedades se observó que el agente de mayor nivel de infestación fue la Varroosis y este patógeno disminuyó al final del experimento en todos los grupos. La fortaleza de las colmenas a los 28 días, solo mostró una tendencia positiva al compararlas con el control en los indicadores, Panales con Miel y con Polen. En el diseño utilizado en el ensayo de campo, no se comprobó efecto probiótico del jarabe inoculado.

## **Synthesis:**

The research was carried out in a teaching-experimental apiary (LARISA), between the months of March-June, 2018 and aimed to verify the probiotic effect of the syrup inoculated with strains of *Lactobacillus kunkeei* SS70 and *Lactobacillus rhamnosus* SS73 on health indicators in honey bee colonies *Apis mellifera*. The experimental design included 2 problem groups and 1 control, representing different sucrose concentrations, (125 g / L and 50% v / v). The growth of the strains used in an alternative culture medium was initially evaluated. In the field experiment, the following indicators were evaluated at the beginning and at the end of the stage (28 days): consumption of syrup inoculated per hive, rate of infestation of the main diseases and strengths of the hives. No significant differences were found in the growth of the strains between conventional-MRS and alternative-MISSEL media. The field results showed that, at the level of syrup consumption, no significant differences were observed between the experimental groups, demonstrating that the inoculum does not influence the palatability of the syrup. In the initial diagnosis of the diseases it was observed that the agent with the highest level of infestation was Varroosis and this pathogen decreased at the end of the experiment in all the groups. The strength of the beehives at 28 days, showed only a positive tendency when compared with the control in the indicators, honeycombs with honey and with pollen. In the design used in the field trial, no probiotic effect of the inoculated syrup was found.



## **Introducción:**

Las abejas melíferas (*Apis mellifica* 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, las que se ocupan de polinizar infinidad de cultivos que forman parte de la cadena trófica del hombre (Verde *et al.*, 2013, Breeze *et al.*, 2016).

La evolución de la clase Insecta y del orden Hymenoptera, donde figuran las abejas ocurrió hace aproximadamente 180 millones de años, (Carpana 2004). Existen tres subfamilias que conformaron la familia Apidae (Meliponinae, Bombinae y Apinae), logró alcanzar mejores adaptaciones la Apinae. El género *Apis* consiguió mayor distribución en el mundo y 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).

Todas las abejas presentan características anatómicas, fisiológicas y conductuales que las hacen dependientes de las plantas, representando entre 73 y 88 % de la polinización entomógama (entomófila). 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 (Noticias ApiNews, 2013).

La apicultura mundial se trabaja hoy en ecosistemas que, en su mayoría, se encuentran deteriorados por causas antrópicas. 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 sometiéndolos a presiones y modificaciones antrópicas complejas y estresantes (Goulson *et al.*, 2015). Este tema es menos estudiado en lo que respecta al efecto de este tipo de agricultura en la nutrición y el equilibrio de las abejas insertadas en estos agroecosistemas (Verde, 2014, Porrini *et al.*, 2016).

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 (Martín y AA.VV. 2009).

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, Labatut 2013).

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 agroindustrial que propician la cohesión del sector (PCC, 2016). De igual forma el manejo integrado para el control de las enfermedades incluye el control de las enfermedades transmisibles sin el uso de medicamentos, ayudando así a obtener producciones inocuas (MINAG, Resolución 547/2013).

El desarrollo de nuevas estrategias con un enfoque integral que persiga mejorar globalmente el rendimiento y el bienestar de las abejas para que jueguen su rol como polinizadores, así como reducir la presencia de patógenos y gérmenes oportunistas en las explotaciones apícolas con tales fines, se seguirá intensificando en los próximos años, ante el futuro marco legislativo referente a la salud y la nutrición de esta especie.

Una alternativa a esa problemática pasaría por la manipulación de la microbiota del tracto digestivo de las abejas 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 (Janashia *et al.*, 2018).

El empleo de probiótico como terapia no farmacológica para la prevención de algunas deficiencias sanitarias de origen microbiano en las abejas permite mantener e incrementar la producción de alimentos de manera sustentable y agroecológica.

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en forma adecuada al huésped producen efectos benéficos sobre su salud” (FAO, 2002, Hill *et al.*, (2014). Las bacterias del género *Lactobacillus* y las levaduras han sido las más estudiadas con esos fines (Ahmed *et al.*, 2013).

La inclusión de probióticos o microorganismos potencialmente benéficos en las dietas para abejas ha demostrado eficacia para mejorar la salud del huésped y el medio ambiente (Khaled *et al.*,2018). Los indicadores higiénico-sanitarios se mejoran en la colonia 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).

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 (Kuzyšínová *et al.*, 2016). 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.

**Problema científico.**

¿Tiene efecto probiótico el suministro de *Lactobacillus spp.* inoculados en jarabe sobre indicadores de salud en colonias de abejas *Apis mellífera*?

**Hipótesis:**

Si se le suministrara jarabe inoculado con *Lactobacillus spp.* a las colonias de abejas, entonces estamos en condiciones de mejorar los indicadores de salud.

**Objetivo general:**

- Comprobar el efecto probiótico del jarabe inoculado con *Lactobacillus spp.* sobre indicadores de salud en colonias de abejas *Apis mellífera*.

**Objetivos específicos**

- Evaluar el crecimiento de *Lactobacillus spp.* empleados en la inoculación del jarabe en un medio de cultivo alternativo.
- Determinar el efecto probiótico del jarabe inoculado con *Lactobacillus spp.* sobre el consumo e indicadores de salud en colonias de abejas *Apis mellífera*.
- Evaluar el efecto probiótico del jarabe inoculado con *Lactobacillus spp.* sobre la fortaleza de las colonias de abejas *Apis mellífera*.

## **I. Revisión bibliográfica.**

### **1.1. La importancia de las abejas**

La Apicultura es la ciencia y arte que estudia el cultivo y manejo de la abeja melífera del género *Apis*, no obstante, también se consideran otras especies de himenópteros con potencial de polinización y de producción de miel. La especie *Apis mellífera* es de interés especial por ser la más productiva y como consecuencia, la más manejada en la apicultura a nivel mundial (Vidal, 2012).

La apicultura moderna comienza con la creación de los panales y los cuadros móviles, en virtud que no se destruyen los mismos al realizar la cosecha de miel, las hojas de cera estampada y los extractores mecánicos, alcanzando su esplendor a fines del siglo XIX y a principios del siglo XX, gracias a los trabajos de muchos estudiosos (Wikipedia, 2013).

Los primeros rasgos de la apicultura se remontan en la antigüedad. Los chinos, los griegos, los romanos y los egipcios, ya poseían colmenas de paja o tierra cocida. Durante mucho tiempo, en Europa la miel era el único medio para endulzar los alimentos (antes de la llegada de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera) y la cera un producto necesario al alumbrado. (MAG-CONAPIS, 2004).

Los antiguos egipcios, asirios, chinos y romanos usaron la miel en combinación con hierbas para tratar heridas y enfermedades del intestino. En la Grecia antigua, Aristóteles afirmaba que la miel podría aplicarse como un ungüento para las heridas y el dolor de ojos. Dioscórides alrededor del año 50 D.C, recomendaba la miel para el tratamiento de quemaduras del sol, manchas en la cara y todo tipo de úlceras (Ulloa *et al.*, 2010).

Actualmente los principales productos que se obtienen de la apicultura son miel, polen, jalea real, propóleos, veneno de abejas, siendo la miel el producto principal; la cual es empleada en la industria para la elaboración de bebidas, medicamentos, cosméticos y otros productos (SAGARPA, 2004, citado por Hernández, 2008).

La abeja es sin duda uno de los insectos voladores más familiares de los hábitats terrestres. La abeja pertenece al orden Hymenoptera, familia Apidae, y es miembro del género *Apis* (Karehnke, 2013). El centro de origen es presumiblemente el sudeste de Asia, donde se encuentran la mayoría de las especies. Principalmente, tienen un alcance limitado a las zonas tropicales y montañosas en el sudeste y el sur de Asia, pero dos especies tienen rangos mucho más amplios, por ejemplo, *A. mellifera* y *A. ceranae*. Diez especies son generalmente reconocidas dentro del género *Apis* (Arias y Sheppard 2005). Los análisis filogenéticos basados en marcadores nucleares y mitocondriales de ADN apoyan fuertemente a un grupo en tres subgrupos distintos: abejas que anidan en cavidades (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. koschevnikovi*, *A. nulensis*), abejas gigantes (*A. dorsata*, *A. laboriosa*, *A. binghami*, *A. nigrocincta*), y las abejas enanas (*A. florea*, *A. andreniformis*) (Raffiudin y Crozier 2007).

*A. mellifera*, que es la abeja melífera más ampliamente distribuida en el mundo debido a su gran potencial de recolección de miel. La distribución nativa de *A. mellifera* incluye África, Europa y Asia occidental, y la datación molecular sugiere que la población se expandió en este rango hace alrededor de un millón de años. Se han propuesto hipótesis contradictorias para el origen de esta expansión (Medio Oriente y África), aunque un trabajo reciente ubicó a *A. mellifera* más cerca de las otras especies de *Apis*, todas restringidas a Asia (Wallberg *et al.*, 2014).

La especie incluye 25 subespecies o razas geográficas descritas por análisis morfométrico y molecular y agrupadas en ramas evolutivas en función de sus similitudes morfológicas.

Las abejas tienen una vida social extremadamente elaborada, que cumple el requisito del "superorganismo"; el "superorganismo" de colonias de abejas consiste en componentes individuales, de grupos y de colmenas, con un amplio repertorio de conductas socialmente interactivas y homeostáticas (Hölldobler *et al.*, 2009). Suelen vivir en colonias con homeostasis intracolonia, que consiste en una sola reina, aproximadamente 10-30 mil trabajadoras "estériles", y de cero a unos pocos miles de zánganos, según la época del año (Page y Peng 2001). Los

alimentos se almacenan en áreas designadas del nido, y las abejas obreras usan secreciones glandulares para alimentar a la cría. La división del trabajo está bien desarrollada y regulada por feromonas (Moritz y Southwick 1992).

### **1.2. Polinización.**

Las abejas son de importancia crítica en el medio ambiente, sustentan la biodiversidad y proporcionan polinización esencial para una amplia gama de cultivos y plantas silvestres (EFSA 2017).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que de las 100 especies de cultivos que proporcionan el 90% de los alimentos en todo el mundo, 71 son polinizadas por abejas (Copping 2013). La mayoría de los cultivos cultivados en la Unión Europea dependen de la polinización de insectos. El valor monetario anual de la polinización se ha estimado en miles de millones de dólares (Hedtke *et al.*, 2015). Contribuyen a la salud y el bienestar de los humanos directamente a través de la producción de miel, que es producida por las abejas a partir del néctar que reúnen, producen además otros alimentos como polen, cera, propóleos y jalea real, utilizados estos como suplementos e ingredientes dietéticos en los alimentos (Ajibola *et al.*, 2012). También pueden considerarse importantes bioindicadores de contaminación ambiental (Celli y Maccagnani 2003,).

Dada la importancia de las abejas melíferas en el ecosistema y la cadena alimentaria, y dados los múltiples servicios que brindan a los humanos, su protección es fundamental. Más allá de la esencialidad de la abeja por la producción de miel como alimento balanceado en vitaminas y rica en antioxidantes, la abeja es vital para la humanidad por su contribución a la biodiversidad y, hasta cierto punto, a la supervivencia humana (Moore y Kosut 2013).

### **1.3. Patógenos que afectan a las abejas.**

Las extensas pérdidas de colonias de abejas en los últimos años se están convirtiendo en una causa importante de preocupación. Desafortunadamente, continuamente enfrentan amenazas (enfermedades, cambio climático y prácticas de gestión); Las abejas melíferas manejadas son altamente sociales, frecuentan

una multitud de nichos ambientales y comparten continuamente alimentos, condiciones que promueven la transmisión de parásitos y patógenos.

### **1.3.1. Patógenos de cría**

*Melissococcus plutoniusis* es el agente causal de la loque europea (EFB) que afecta a las larvas de abejas melíferas en *Apis mellifera* occidental. Sin embargo, la bacteria también puede infectar y matar la cría de la abeja oriental (*Apis ceranae*) y la abeja melífera del Himalaya (*Apis laboriosa*) (Allen *et al.*, 1990). *M. plutonius* es un coco no formador de esporas con una estrecha relación filogenética con el género *Enterococcus* (Cai y Collins 1994).

Las células bacterianas se ingieren con alimentos contaminados e invaden el intestino medio donde se reproducen, asimilando la comida de las larvas. Las larvas infectadas pueden morir antes o después del estado de la inanición (Bailey 1983), o pueden pupar exitosamente y formar adultos normales o de tamaño insuficiente.

Después de la infección, los invasores secundarios, como *Paenibacillus alvei* y *Enterococcus faecalis*, están involucrados en la descomposición de los restos larvales. Las larvas muertas se encuentran retorcidas alrededor de las paredes de la celda o estiradas a lo largo. Estas larvas se vuelven amarillas y luego marrones y finalmente se descomponen, adoptando un color negro grisáceo (Forsgren 2010). Aunque la sintomatología está bastante bien descrita, muchos aspectos de la patogénesis, la transmisión y el control de *M. plutonius* son poco conocidos y siguen siendo difíciles de alcanzar (Genersch 2010, Gaggia *et al.*, 2015).

*Paenibacillus* spp es un bacilo Gram-positivo formador de esporas que causa la loque americana (AFB) (Genersch *et al.*, 2006), que contaminan las larvas en primera instancia que conducen a su muerte después del recubrimiento de las células. La AFB no solo es mortal para las larvas de abejas, sino que también provoca el colapso de todas las colonias. Además, la AFB es altamente contagiosa y las esporas son extremadamente tenaces.

En cuanto al EFB, la infección se origina por la ingestión de alimentos contaminados con esporas; una vez en el intestino medio, las esporas germinan y



las células vegetativas se reproducen e invaden el hemocoel (Bailey y Ball 1991), al sintetizar proteasas extracelulares altamente activas (Hrabák y Martínek 2007). En la segunda etapa, las larvas se vuelven un coloide pardusco, semifluido, parecido al pegamento (etapa ropy) que libera un olor pútrido. El aspecto ropy (las larvas muertas se adhieren y forman un tramo de hilo cuando se toca con un palo de madera) confirmando la presencia de AFB. Finalmente, la larva permanece seca hasta una escara dura (escara de loque), que se adhiere firmemente a la pared celular inferior. Las escamas contienen millones de esporas, que podrían distribuir la infección durante muchos años dentro de las colonias y entre ellas (Bailey y Ball 1991).

Para ambas loquetas, algunos apicultores usan antibióticos (especialmente en los EE. UU. Y otros países no europeos), lo que genera preocupación por la resistencia a los antibióticos, las pérdidas colaterales de microbios beneficiosos y los riesgos de residuos de antibióticos en la miel y el polen destinados al consumo humano.

El hongo *Ascosphaera apis* es responsable de la enfermedad de cría de tiza; las larvas se infectan al ingerir esporas de hongos que germinan en el tracto digestivo. El posterior crecimiento micelial es letal para las larvas. Las larvas muertas y las pupas se desecan, formando momias que contienen millones de esporas y que son altamente infecciosas (Aronstein y Murray 2010). *A. apis* es responsable de grandes pérdidas económicas, particularmente en combinación con otros patógenos como *Nosema apis* (Aydin *et al.*, 2006), *N. ceranae* y *V. destructor* (Hedtke *et al.*, 2008).

### **1.3.2. Nosema apis and Nosema ceranae**

Las abejas adultas hospedan *Nosema apis* dos parásitos pertenecientes al phylum fúngico Microsporidia - y *Nosema ceranae*, los cuales han recibido una gran atención, en particular *N. ceranae*, que se movió, en las últimas décadas, de su huésped asiático natural (*Apis cerana*) al Europeo, encontrando un terreno fértil para su desarrollo (Rosenkranz *et al.*, 2010). Recientemente, se hizo evidente que *N. ceranae* también está muy extendida en la población de *A. mellifera* en todo el mundo, particularmente en países con clima templado

(Giersch *et al.*, 2009). Debido a su distribución y severidad, ahora se considera uno de los principales problemas de salud tanto en las abejas melíferas individuales (Paxton *et al.*, 2007; Antúnez *et al.*, 2009) como en colonias enteras (Higes *et al.*, 2008).

### **1.3.3. Espiroplasmosis**

Los espiroplasmas son eubacterias pequeñas, helicoidales y móviles y son descendientes de bacterias Gram positivas que carecen de una pared celular (Regassa y Gasparich 2006). *Spiroplasma melliferum* y *Spiroplasma apis* son dos patógenos de abejas adultas que se han identificado en abejas melíferas occidentales (Mouches *et al.*, 1982), pero también se ha informado de infección en Asia y EE. UU. La patogénesis ocurre cuando los organismos rompen la barrera intestinal e invaden la hemolinfa, causando una infección sistémica que en última instancia puede conducir a una enfermedad mortal en la abeja. Las infecciones por espiroplasmas son mucho más difíciles de reconocer y diagnosticar que las enfermedades por loque, lo que dificulta la capacidad de controlar la abundancia bacteriana y el impacto en la industria apícola. Siguen siendo objetivos interesantes para el estudio, debido a su abundancia estacional en las colonias de abejas melíferas, lo que presumiblemente está vinculado a los ciclos de floración de plantas específicas que actúan como sitios de transmisión (Morimoto *et al.*, 2013) y Plischuk *et al.*, 2011).

### **1.3.4. Varroa destructor**

*Varroa destructor* es un parásito de ácaro de abejas. Originalmente, un parásito de la abeja asiática *Apis cerana* que generó un cambio de huésped a principios de la década de 1970 a la abeja europea *Apis mellifera*. Dónde y cómo ocurrió este cambio no está claro (Rosenkranz *et al.*, 2010), de todos modos desde entonces el parásito ha cruzado el mundo, y se considera endémico en todas las colmenas del mundo. Hasta la fecha, solo Australia y algunos territorios del norte de Europa (Islas Åland e Isla de Man) resultan como áreas libres de *V. destructor*.

*Varroa* se alimenta de la hemolinfa de las larvas y las abejas adultas, lo que debilita al insecto. Pero este no parece ser el factor determinante que conduzca al colapso de la colonia. De hecho, *varroa* infecta a las abejas con una cantidad

relevante de virus como el virus ala deformado (DWV), el virus crónico de la parálisis de las abejas (CBPV), el virus negro de la reina (BQCV) y el virus de la sábor (SBV). Hasta la fecha, 16-18 virus verdaderamente únicos (24 si se consideran las variantes) han sido identificados como patógenos para las abejas (De Miranda *et al.*, 2013).

Se han utilizado diferentes enfoques para eliminar el parásito varroa de las colmenas. Más recientemente, los apicultores centraron sus esfuerzos en enfoques orgánicos, utilizando ácidos orgánicos como ácido oxálico, fórmico y láctico junto con métodos de captura de peines. (Goodwin *et al.*, 2006). Aún hoy en día, la varroosis se puede clasificar en la lista de factores bióticos desestabilizadores para las abejas melíferas.

#### **1.4. Composición de la microbiota intestinal de las abejas. Importancia**

##### **1.4.1. Composición de la microbiota del intestino de las abejas.**

Las herramientas moleculares y los nuevos métodos de secuenciación del ADN permitieron a los investigadores investigar la microbiota intestinal de *A. mellifera*, dando una información más consistente de su composición y papel en la salud de los insectos en comparación con las metodologías dependientes del método de cultivo. En el pasado, se identificaron varios microorganismos (*Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium* spp.), junto con mohos y levaduras, a partir de intestino de abeja mediante técnicas basadas en el cultivo en placas (Gilliam 1997, Scardovi y Trovatelli 1969). Los mohos, particularmente los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, se encontraban comúnmente en el tracto alimentario de abejas obreras (Gilliam *et al.*, 1977) y la presencia de levadura parecía ser un indicador de las condiciones de estrés en las abejas melíferas (Gilliam 1997). Todavía hoy, el aislamiento del recuento de placas y la identificación posterior permiten la recuperación de nuevas especies que solo podrían detectarse mediante la microbiología tradicional. Este es el caso de especies bacterianas intestinales recientemente caracterizadas como *Gilliamella apícola*, *Snodgrassella alvi*, *Frischella perrara*, *Lactobacillus kullabergensis*, *L. kimbladii*, *L. helsingborgensis*, *L. mellis*, *L. mellifer* y *L. melliventris* (Kwong y Moran 2013; Olofsson *et al.* 2014).

A nivel mundial, la composición y la función de la comunidad microbiana que habita el tracto gastrointestinal de las abejas está estrechamente relacionada con los cambios fisiológicos y los regímenes nutricionales asociados con la edad y las tareas de las abejas. Los alimentos que consumen fuera de la colmena, casi exclusivamente néctar y miel para satisfacer las demandas metabólicas del vuelo (Winston 1987), mientras que las abejas consumen también grandes cantidades de polen almacenado para satisfacer las demandas nutricionales de sintetizar y secretar jalea real para larvas y otros adultos (Anderson *et al.*, 2011), Las investigaciones permitieron establecer que una comunidad bacteriana "central" ha coevolucionado con la abeja durante millones de años y ahora representa un componente relativamente estable y constitutivo de las abejas sanas independientemente de la geografía.

Un estudio reciente mostró que el aislamiento de estómago de abejas recolectoras estaba dominado por *Lactobacillus* con el predominio de *L. kunkeei* y Alpha 2.2 (Acetobacteraceae) pero también contenía un pequeño número de Enterobacteriaceae, aunque menos abundantes y que probablemente tienen su origen en el ambiente de polinización (Corby-Harris *et al.*, 2014). Otros estudios basados en métodos de cultivo en placa evidenciaron una microbiota de cultivo compuesta de varias especies bacterianas dentro de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Vásquez *et al.*, 2012) con nuevas especies identificadas de lactobacilos (Olofsson *et al.*, 2014). Las propiedades probióticas de estas bacterias se reconocen notablemente en vertebrados donde las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ejercen actividades beneficiosas dentro de la microbiota intestinal (Gaggia *et al.*, 2010).

Las estimaciones de recuentos se mueven en un rango de  $10^2$  a  $10^5$  ufc/mL; sin embargo, el número varía numéricamente entre temporadas con las floraciones visitadas y con el estado de salud de las abejas. Acetobacteraceae y *L. kunkeei* prosperan en ambientes ácidos y ricos en azúcar, como el cultivo, el pan de abeja y la miel, y se consideran bacterias de la colmena central, ya que están asociadas con enfermeras y larvas en desarrollo (Anderson *et al.*, 2013). Los cultivos bacterianos son un órgano central en la producción de alimentos (panales y miel) y el almacenamiento de alimentos, y todas las bacterias aisladas ejercen una

función importante, por ejemplo, producción de exopolisacáridos y compuestos antimicrobianos, formación de biopelículas, actividades de fermentación e inhibición de microorganismos deteriorantes (Olofsson y Vásquez 2008; Forsgren 2010).

El intestino medio contiene relativamente pocas bacterias, estando más concentradas en la región distal, junto al intestino posterior. El intestino grueso alberga una gran comunidad bacteriana dominada por ocho grandes grupos bacterianos (Moran 2015): dos Alphaproteobacteria (Bartonellaceae y Acetobacteraceae), dos Gammaproteobacteria (*Gilliamella apicola* y *Frischella perrara*), dos miembros del filo Firmicutes con diferentes especies de lactobacilos (Firma 4, Firma 5), una Betaproteobacteria (*Snodgrassella alvi*) y una especie del género *Bifidobacterium* (*B. asteroides*).

## **1.5. Alimentación artificial de las abejas.**

### **1.5.1. Alimentación artificial**

La alimentación artificial de las abejas surge como una necesidad del hombre con miras a mejorar los beneficios económicos de su explotación apícola sobre todo en lugares donde naturalmente no existen buenas condiciones (López-Hurtado, 2014).

Por otro lado, el único motivo que induce a las abejas a morir trabajando es el de guardar o almacenar alimento para poder sobrevivir durante la época de escasez de polen y néctar que generalmente coincide con el invierno (SAG, 2005).

Para efectos de rendimiento de una colmena, se debe alimentar artificialmente con una anticipación de 40 días antes de larga floración; de esta manera, la reina al sentir que ha ingresado alimento a la colmena comienza la postura. También hay una fuerza pecoreadora potente en la colmena para un máximo aprovechamiento de la flora melífera.

Ríos y Grández (2008), indican que la alimentación artificial se suministra mediante alimentadores en forma de bastidores o bolsas plásticas existiendo diversas formulaciones de jarabe, entre las que destacan: Azúcar (40%) + agua (60%), para incrementar la postura de la reina; azúcar (50%) + agua

(50%), para mantener población y estimular la postura; miel (50%) + agua (50%), es la mezcla más empleada por los apicultores para mantenimiento o estímulo a la postura.

Marchelli y García (2010), mencionan que en el suministro del alimento se debe considerar la fortaleza de la colonia, la época del año y las condiciones de la vegetación que aporta néctar y polen de la región. En colonias débiles, si se alimenta en exceso, las abejas no se terminan el alimento lo que ocasiona que se y/o se formen mohos.

### **1.5.2. Jarabe de azúcar**

Root (1981), citado por Bernal (1999), manifiesta que la alimentación de las abejas con azúcar, jarabe de azúcar o miel, es practicada con dos fines: para evitar el hambre en las colonias y para estimular el desarrollo de cría en épocas del año en que no se obtiene miel de fuentes naturales. Además señala que para proveer de alimento a la colonia como estimulante de la puesta de la reina, a falta de miel, puede hacerse con azúcar en la proporción de 33 % de azúcar y 66 % de agua suministrado muy lentamente. Expresa asimismo que se suministra el jarabe en pequeñas dosis, para estimular la crianza y continua así hasta el momento de iniciarse la gran mielada en el campo.

La alimentación artificial mediante jarabe (que contiene una proporción de 1 Kg de azúcar / litro agua) aumenta el número de cuadros de puesta (Prost, (1981). De igual manera, Hernández (2008), asegura que el jarabe de azúcar como estrategia de alimentación artificial es una buena fuente de nutrientes para las abejas durante la época crítica. Así mismo Agrobio (2009), indica que la abeja posee las enzimas metabólicas necesarias, como la invertasa, para poder aprovechar bien la sacarosa. Al respecto, Cervantes (2010), trabajando con alimentación artificial de abejas, concluye que el alimento más consumido fue el jarabe de azúcar con 2000 ml, cuando comparó con glucosa de maíz de 1500 ml, demostrando este su mayor palatabilidad.

### **1.5.3. Azúcar morena.**

El azúcar moreno, también llamado “negro” o “crudo”, cuando es auténtico ha sido extraído del jugo de la caña de azúcar sin refinar ni procesar, sino

tan sólo cristalizado. Normalmente contiene entre un 96 y un 98% de sacarosa y su color amarillento se debe al porcentaje de sacarosa que se le ha extraído y a una película de melaza que envuelve cada uno de sus cristales. (Galiano, 2012, Wikipedia, 2013).

### **1.6. Probiótico**

El científico Elie Metchnikoff 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 (Mennickent & Green, 2009).

Parker en 1974 definió a los probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal” (Gibson & Fooks, 2002).

Salminen en 1998 posteriormente, conceptualizó a los probióticos como “Alimentos que contienen bacterias vivas las cuales son beneficiosas para la salud” (Mennickent & Green, 2009).

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 (Lee, 2009).

Finalmente según la FAO/OMS se define como “Organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped”.

Los microorganismos empleados como probióticos, son hongos y/o bacterias comensales que forman parte de la flora gastrointestinal, vaginal y de la boca, se citan los siguientes géneros entre las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *bouardii* y entre las bacterias *Bacillus*, bacterias ácido lácticas destacándose el *Bifidobacterium* y para efectos del presente estudio el *Lactobacillus*” (Rodrigues *et al.*, 2012).

## 1.7 Aplicación de microorganismos benéficos en las abejas.

### 1.7.1 Aplicación de Microorganismos Benéficos

Los experimentos que prevén la administración de bacterias beneficiosas a las abejas melíferas son diversos y en ocasiones confusos. El objetivo principal es contrarrestar los patógenos más extendidos que afectan tanto a larvas como a adultos ya que las pruebas in vitro en muchas ocasiones evidencian interesantes propiedades de protección del huésped estimulando directamente el sistema inmune de la abeja e inhibiendo patógenos mediante exclusión competitiva y producción de compuestos antimicrobianos (ácidos orgánicos y metabolitos secundarios, por ejemplo, bacteriocinas y lipopéptidos). Las cepas generalmente se aíslan del cultivo / intestino de la abeja melífera o del medio ambiente; el uso de formulaciones para el consumo humano y animal también se considera, pero discutible.

En las abejas melíferas adultas, un patógeno emergente que afecta la salud de las abejas es *Nosema ceranae*, identificado como un microsporidio que se multiplica dentro de las células intestinales sin síntomas relevantes durante la infección (Higes *et al.*, 2010). Se ha asociado con la reducción de la vida útil de las abejas melíferas y el debilitamiento de las colonias (Goblirsch *et al.*, 2013).

Se pueden discutir muchos problemas sobre el uso de experimentos en jaulas. Sabaté *et al.*, (2012) y Audisio *et al.*, (2015) observaron una disminución en la cantidad de esporas en condiciones de campo en las abejas alimentadas oralmente durante varios meses con cepas aisladas del intestino de insectos sanos, a saber, *B. subtilis* Mori2 y *L. johnsonii* CRL1647. La disminución en la incidencia de *Nosema* observada por Sabaté *et al.*, (2012) solo fue evidente en septiembre y octubre, cuando se observó un ligero aumento de esporas en el grupo de control. Cuando el grupo de control mostró una disminución fisiológica en el número de esporas, no se observó una reducción relevante en los grupos tratados. (Corby-Harris *et al.*, (2014)) observaron una reducción de la carga de esporas en adultos de abejas melíferas provenientes de larvas alimentadas con empanada de polen mezclada con un inóculo de *Parasaccharibacter apium*C6, pero no se puede argumentar si esta reducción observada podría ser efectiva. Además, los autores no especificaron la especie utilizada para la etapa de



infección, que es de importancia fundamental ya que el proceso de infección y la sintomatología son diferentes. Del mismo modo, (Baffoni *et al.*, 2016) observaron una disminución significativa de las abejas infectadas con *N. ceranae* alimentadas oralmente con una mezcla de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacteriums*. Sin embargo, la reducción de ~ 1 log observada en los insectos desafiados y tratados es irrelevante ya que el número de esporas se mantuvo alto y las abejas seguramente morirían. No obstante, en los mismos experimentos, los autores también evidenciaron una reducción significativa en la carga de esporas en abejas expuestas a una infección natural baja. En este caso particular, un efecto protector hipotético, que contrasta la baja tasa de infección, podría considerarse de importancia biológica, ya que podría ser útil para contener el avance de la infección.

Desafortunadamente, el experimento se realizó en jaulas, y se debe prever confirmar el efecto hipotético de las bacterias beneficiosas también en condiciones de campo.

Un enfoque interesante para estudiar las interacciones entre *N. ceranae* y el huésped proviene de Gisder y Genersch (2015). Los autores desarrollaron un modelo de cultivo celular utilizando la línea celular lepidóptera IPL-LD 65Y, de *Lymantria dispar*, que era susceptible a la infección por *N. ceranae* y podría soportar todo el ciclo de vida del microsporidio. Con este enfoque, los autores probaron varias moléculas para determinar la citotoxicidad y la inhibición del desarrollo intracelular de *N. ceranae* y demostraron la eficacia de algunas de ellas.

También se aplican microorganismos benéficos para influir positivamente en la productividad de la colmena, y algunos resultados mostraron un aumento significativo del área de cría, el número de abejas y la producción de miel (Audisio y Benítez-Ahrendts 2011a; Sabaté *et al.*, 2012; Alberoni *et al.*, 2015). En particular, Alberoni *et al.* (2015) también analizaron por NGS el cambio de la microbiota intestinal, y un claro aumento de bifidobacterias y Acetobacteraceae se evidenció en las abejas tratadas después de la suplementación de lactobacilos y bifidobacterias. Ambos grupos bacterianos son endosimbiontes importantes del

intestino de la abeja y tienen implicaciones significativas relacionadas con la fisiología y la protección nutricional del huésped. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para centrarse mejor a nivel intestinal en cómo esta modulación afectaría la interacción microbiana huésped-intestino.

Como ya se mencionó, también se ha probado el uso de bacterias beneficiosas comercialmente explotadas en humanos y animales. Se observó un desarrollo mejorado de células de glándula de cera por Pătruică *et al.*, (2012), después de la suplementación de ácidos orgánicos y un producto probiótico que contiene *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp.

Tanto individualmente como en combinación, influyeron positivamente en el número, la morfología y el diámetro de las células de cera. Sorprendentemente, Andrearczyk *et al.*, (2014) encontraron un aumento de infección por *Nosema* spp, después de la administración en las abejas tanto de invierno como de verano de un producto probiótico recomendado para animales.

Ptaszyńska *et al.*, (2016) observaron una mayor tasa de mortalidad en las abejas infectadas con *Nosema* alimentadas con el probiótico humano *Lactobacillus rhamnosus*, tanto como medida preventiva como a lo largo de la infección. Los autores argumentaron que el aumento de la infección se asoció con una reducción del pH del intestino medio de la abeja melífera, debido a la actividad metabólica del microorganismo suplementado. Sin embargo, esta consideración se basa en datos previos (Ptaszyńska *et al.*, 2013), donde esta asociación no se demuestra clara y estadísticamente y se necesitan más investigaciones para comprender mejor tales interacciones. Sin embargo, el uso de estas cepas es controvertido, ya que es preferible seleccionar y utilizar microorganismos del intestino de abejas melíferas, que poseen el inmenso conjunto de genes para la interacción del huésped.

La producción de compuestos antimicrobianos por simbiontes intestinales para la protección del huésped es otro tema interesante. Un análisis genómico reciente de 13 cepas de BAL, aisladas del tracto gastrointestinal de las abejas, puso en evidencia que la mayoría de ellas producían proteínas extracelulares de función conocida / desconocida relacionadas con la acción antimicrobiana, la interacción

con el huésped o la formación de biopelículas. En particular, se detectó una supuesta bacteriocina novedosa con un 51% de homología con helveticina J en *L. helsingborgensis* Bma5N (Butler *et al.*, 2013).

Al mismo tiempo, se debe decir que algunas cepas no evidenciaron ninguna "función antimicrobiana", lo que confirma la alta variabilidad entre los microorganismos intestinales que habitan los mismos nichos. Vásquez *et al.* (2012) analizaron la interacción de algunos simbiontes BAL con cepas aisladas de abejas mediante SEM y microscopía de fluorescencia. Las imágenes resultantes evidenciaron la formación de biopelículas y estructuras similares a las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que se sabe que están implicadas en la protección / colonización del huésped y el reconocimiento celular (Flemming y Wingender 2010). Un apoyo adicional proviene del trabajo de Ellegaard *et al.* (2015), que evidencia a nivel del genoma la presencia de grupos de genes asociados con la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular en los grupos "Firmeza 4" y "Bifido" (Ellegaard *et al.*, 2015). Martinson *et al.* (2012) informaron, en trabajadores de abejas melíferas, la presencia de genes en *G. apicola* y *S. alvien* codificando un número relevante de funciones relacionadas con la formación de biofilm y la interacción del huésped (pili tipo IV, proteínas de membrana externa y secreción), cuya expresión podría ser relevante para el establecimiento de un micro-nicho duro para la colonización de patógenos. Finalmente, la familia Bacillaceae incluye varias bacterias formadoras de esporas, aisladas del intestino de la abeja y del ambiente de la colmena, que muestran una fuerte actividad antibacteriana contra los patógenos de las abejas. En este caso, la actividad de inhibición se debió principalmente a la producción de diferentes clases de lipopéptidos (Alippi y Reynaldi 2006, Lee *et al.*, 2009, Sabaté *et al.*, 2009, Yoshiyama y Kimura, 2009).

Las aplicaciones de antimicrobianos que podrían ser activos contra diferentes patógenos están emergiendo, ya que tiene la ventaja de ser menos invasivo. Uno de los primeros intentos, realizado por Porrini. (2010), evaluaron el efecto de cuatro metabolitos antimicrobianos diferentes: dos surfactinas (S1 y S2) de *B. subtilis*Mori4 y *B. subtilis*C4 y dos bacteriocinas de *Enterococcus avium*DSMZ17511 y *Enterococcus faecium*CRL1385 (B1 y B2). Los ensayos

realizados (divergentes para el inóculo de esporas de *N. ceranae*, la concentración de metabolitos y el período de administración) revelaron una reducción significativa de la concentración de esporas solo para la surfactina S2. Probablemente, Maggi *et al.*, (2013) probado con éxito, en colmenas infectadas naturalmente con *N. ceranae*, un metabolito puro de *L. johnsonii*CRL1647, compuesto principalmente por ácido láctico (cinco veces a intervalos de 5 días) y acoplado en el último tratamiento con fumagilina. El análisis por abeja individual mostró una disminución significativa del recuento de esporas en las colmenas tratadas en comparación con un control, donde se observó un aumento regular a lo largo del experimento. La disminución se observó tanto antes como después de la aplicación de fumagilina, mostrando así un efecto sinérgico con el tratamiento con antibióticos. Independientemente de los resultados, la estandarización parcial del experimento eligiendo reinas hermanas tiene que ser señalada positivamente.

La investigación en este tema aún está lejos de llegar a la conclusión de que los microorganismos beneficiosos en realidad podrían limitar la propagación de patógenos y apoyar la salud de la abeja y la productividad de la colmena, incluso si los resultados preliminares son prometedores. Hoy en día, los apicultores con frecuencia dependen de subespecies híbridas, con la falsa esperanza de aumentar la resistencia a las enfermedades, pero los mecanismos de resistencia contra los patógenos / parásitos de las abejas son generalmente el resultado de una coevolución en los ecosistemas locales (Ruottinen *et al.*, 2014). Las aplicaciones disponibles ofrecen en cierta medida una imagen de la influencia positiva de estos microorganismos en la salud de las abejas. Sin embargo, el problema principal es cómo la modulación de la microbiota intestinal de la abeja melífera podría influir en la composición de la microbiota intestinal y también albergar inmunidad y fisiología. La proliferación de microorganismos en el medio ambiente es, sin duda, un terreno peligroso que debe investigarse en profundidad para minimizar el riesgo asociado con los tratamientos biológicos.

## II. METODOS Y TECNICAS DE LA INVESTIGACIÓN.

### 2.1. Trabajo de laboratorio.

#### 2.1.1. Cepas

Las cepas utilizadas en los ensayos pertenecen al banco de cepas de *Lactobacillus spp.* del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA) y el Departamento de Medicina Veterinaria de la Facultad Agropecuaria de la Universidad de Sancti Spíritus. Las cepas madres de *Lactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus rhamnosus*, fueron activadas en caldo MRS y posteriormente transferidas para su mantención en un medio no convencional llamado Medio *Infusión de soya, Sacarosa, Extracto de levadura* (MISSEL) elaborado a partir del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya, del Combinado Lácteo "Río Zaza" y contiene además levadura liofilizada del proceso de obtención de fructooligosacáridos del Centro de Biotecnología de Sancti Spíritus (tabla 1). Para comprobar la efectividad del medio, ambas cepas utilizadas en el ensayo se sembraron por triplicado en el medio convencional para *Lactobacillus* (MRS) y el medio alternativo (MISSEL).

#### 2.1.2. Crecimiento de las cepas en alimento artificial (jarabe).

##### ***Preparación del jarabe.***

El jarabe utilizado como alimentación artificial en las colmenas fue elaborado en dos variantes: Una parte de azúcar cruda y una parte de agua (50% v/v) y 125 g de azúcar cruda/litro de agua (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011). En ambos casos fueron hervidas durante diez min, descartándose el sobrenadante; luego de enfriarse se ajustó a pH 6 y dispensadas en frascos plásticos *a razón de 495 mL para ambos grupos y 500 ml para el grupo control*

##### ***Inoculación del Jarabe:***

El inóculo utilizado fue preparado sobre la base del medio *Infusión de soya, Sacarosa, Extracto de levadura* (MISSEL), tabla 1. Para la inoculación del jarabe a cada frasco de 495 mL se le añadió 5 mL de un cultivo que fue incubado durante toda la noche (incubación de 18-20 h) en el MISSEL a una concentración

entre  $1 \times 10^6$  UFC/mL y  $1 \times 10^7$  UFC/mL e inmediatamente fue trasladado al apiario para ser administrado a las abejas.

**Tabla 1.** Composición del Medio Infusión de soya-sacarosa-Extracto de levadura (MISSEL).

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad 500 mL</b>	<b>Nivel de Inóculo (<math>1 \times 10^6</math> UFC/mL)</b>
<b>Infusión de soya</b>	500 mL	
<b>Extracto de Levadura</b>	2.5	
<b>Sacarosa</b>	10	
<b>pH</b>	6.5	
<b>Cepa inoculada en MISSEL, (overnight)</b>		5 mL

## **2.2. Trabajo de Campo**

### **2.2.1. Ubicación de los ensayos.**

La parte experimental se desarrolló en el apiario Docente-Experimental perteneciente a Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), ubicado en el Municipio Sancti Spíritus, Provincia Sancti Spíritus, Cuba. Las colmenas de tipo Langstroth modificadas se encontraban dispuestas en una hilera de norte a sur y aproximadamente a un metro de altura de la superficie del suelo. El soporte utilizado son bloques de cemento que encima tienen colocado railes de ferrocarril como base de ubicación de las colmenas (fig. 1). Fuera de la época de hambruna son áreas ricas en flora, las cuales son utilizadas como fuente de alimentación.

### **2.2.2. Administración de las cepas y conformación de los grupos.**

Las células viables de *Lactobacillus spp.* (Concentración  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  ufc/mL) fueron administradas a las abejas por un alimentador de fabricación local de 500

mL de capacidad (pomos plásticos) que contenían las variantes de jarabe (50% v/v, y 125 g/L). Para alcanzar la mayor homogeneidad posible de las colonias al inicio del experimento se tuvo en cuenta la disponibilidad de panales existentes y el total de colmenas. Para la reorganización definitiva del apiario se tuvo en cuenta la siguiente fórmula

$$\text{Prom. P (C.A-C.C-P.M- P.P) = T. P (C.A-C.C-P.M- P.P) / Total de colmenas}$$

**Donde:**

- **Prom. P:** Promedio de Panales
- **C.A:** Crías abiertas.
- **C.C:** Crías cerradas
- **P.M:** Panales con miel
- **P.P:** Panales con polen).
- **P:** Panales
- **T.P:** Total de Panales

Después de la reubicación de las colonias se confeccionaron dos grupos tratados (I y II) de 4 colmenas cada uno y un tercero (III) de igual número de colmenas, que no se trató y sólo recibieron el jarabe 50 % v/v (tabla 2).

**Tabla 2:** Conformación de los grupos para el ensayo.

<b>Conformación de los grupos</b>	<b>Distribución de las colonias por grupos</b>			
<b>Grupo I Tratado 50%</b>	4	6	9	12
<b>Grupo II Tratado 125%</b>	3	10	14	15
<b>Grupo control</b>	2	8	11	13

### **2.2.3. Esquema de administración de las cepas:**

Se realizó una vez a la semana, con reposición del alimentador, el experimento se prolongó durante cuatro semanas (28 días). El desarrollo de las colonias de las colmenas fue monitoreado diariamente. Todas las demás condiciones (el clima, la posición geográfica, la nutrición y la supervisión) fueron idénticos.

### **2.2.4. Comportamiento de las colonias.**

#### ***Estado sanitario:***

Para evaluar el estatus sanitario de las colonias se realizaron dos controles diagnósticos, uno el día inicial (primer día) y el segundo al final del experimento (día 28), se midieron los niveles de infestación de las principales enfermedades declaradas por el sistema de vigilancia Estatal de Sanidad Animal, siguiendo para ello los protocolos descritos en las normas cubanas (Varroosis NC-960: 2013 y Nosemosis NC-1009: 2014, Acarapisosis NC: 961: 2013).

#### ***Fortaleza de las colmenas.***

Para valorar desde el punto de vista productivo el efecto del jarabe inoculado con las cepas de *Lactobacillus spp.* sobre el comportamiento de las colonias se tuvo en cuenta la fortaleza individual de las colonias que incluyó las variables que se reflejan a continuación: panales de crías abiertas, panales de crías cerradas, panales con miel y panales con polen.

#### ***Consumo de jarabe por colmena.***

Para valorar el consumo de jarabe durante el experimento de cada uno de los grupos se recolectó los alimentadores artificiales en cada uno de los momentos de la reposición de los mismos y se llevó al laboratorio para depositar el sirope no consumido en una probeta calibrada y medir el volumen residual y por diferencia se determinó el volumen consumido.

$V_c = V_i - V_r$ . Donde  $V_c$ = Volumen consumido,  $V_i$ = Volumen de sirope inicial,  $V_r$ = Volumen de sirope residual en el alimentador.



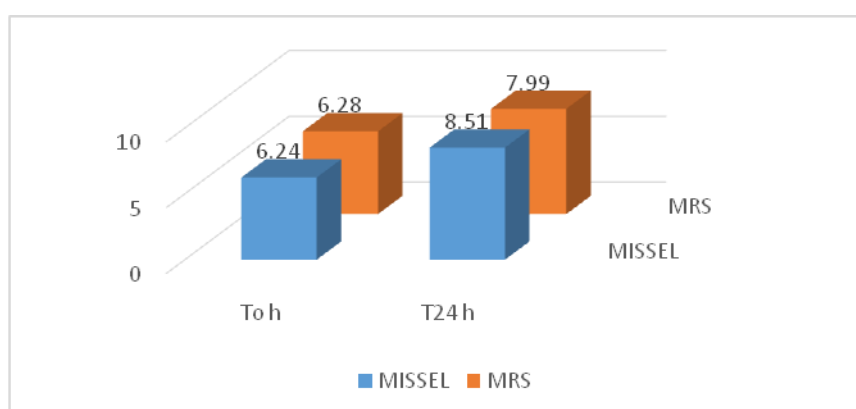
### **2.3. Análisis estadístico.**

Los datos fueron tratados mediante técnicas estadísticas clásicas (estadística descriptiva, cálculo de estadísticos de tendencia central y dispersión, análisis de la varianza, pruebas de comparación de medias y contrastes y prueba de chi cuadrado), aplicándose cada una de ellas de acuerdo con el tipo de variable a analizar.

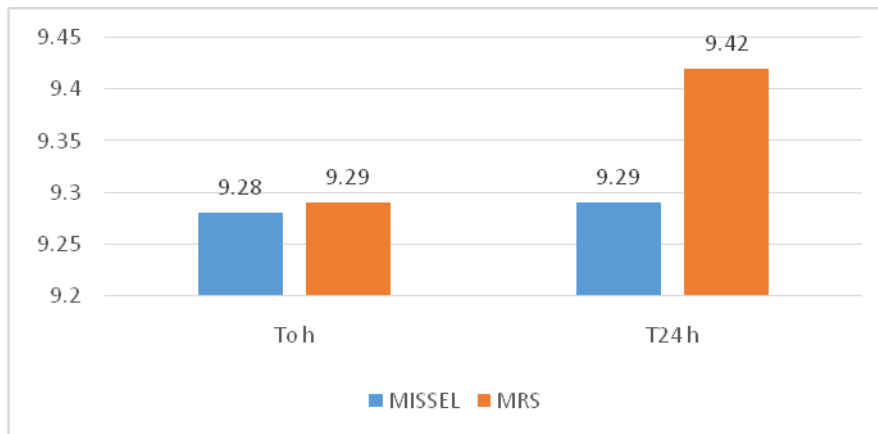
### III. RESULTADOS Y DISCUSION

Las cepas de bacterias utilizadas como inóculo en el ensayo, *Lactobacillus kunkeei* se reporta como lactobacilos predominantes en diversos medios asociados a las abejas y también se ha aislado del tracto intestinal de abejas *A. laboriosa* y *A. mellifera* (Tajabadi *et al.*, 2011, Corby-Harris *et al.*, 2014) y *Lactobacillus rhamnosus*, fue aislado en estudios vinculados a las abejas, (Tajabadi *et al.*, 2012; Belhadj *et al.*, 2014). De igual forma; se encontró en ensayos a nivel de laboratorio para evaluar propiedades probióticas de estas cepas, un comportamiento positivo en las pruebas utilizadas (Amaró-Balmaseda, 2017).

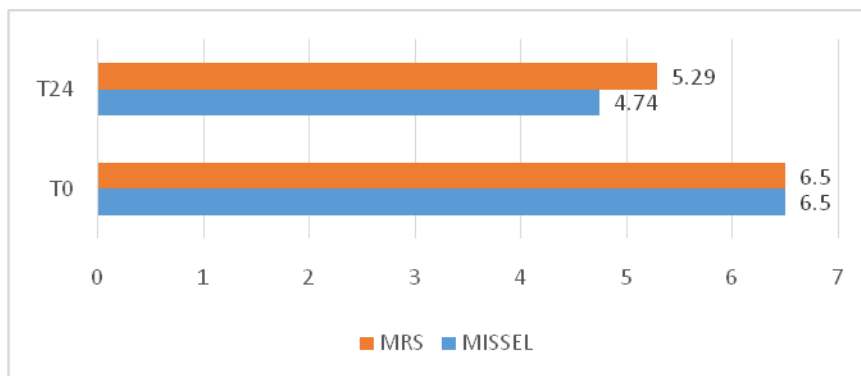
La necesidad de encontrar fuentes alternativas para la multiplicación de las BAL como probiótico permitió incluir en el medio de cultivo desarrollado a nivel de laboratorio el residual de la línea de ablandamiento del grano de soya, del Combinado Lácteo "Río Zaza", enriquecido con levadura liofilizada del proceso de obtención de fructooligosacáridos (FOS) con *Schedonorus arundinaceus* (Hernández *et al.*, 2018). No se encontraron diferencias significativas, en los recuentos bacterianos en ninguna de las cepas empleadas en la inoculación del jarabe, entre el medio alternativo y el medio convencional (Figura. 1 y 2). *L. kunkeei* redujo el pH en el medio MISSEL a valores más bajo que en el medio MRS, comportamiento inverso mostró *L. rhamnosus*. (Figura. 3 y 4).



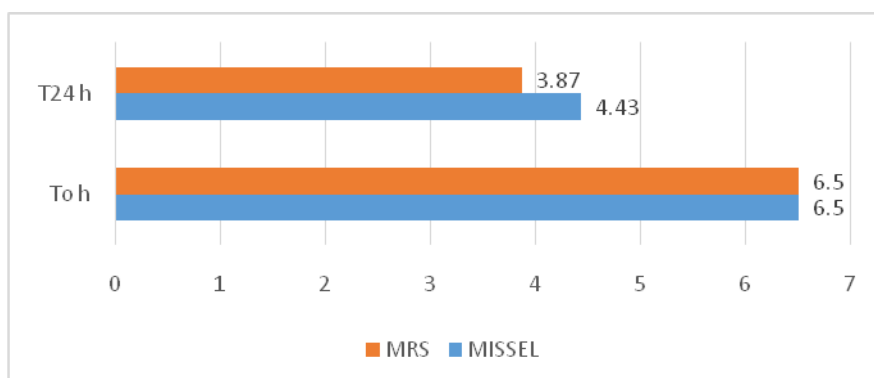
**Figura. 1** Recuento de *Lactobacillus kunkeei* en los medios MRS y MISSEL.



**Figura. 2:** Recuento de *Lactobacillus rhamnosus* en los medios MRS y MISSEL.



**Figura. 3:** Variación del pH durante el crecimiento de *Lactobacillus kunkeei* en los medios MRS y MISSEL.



**Figura. 4:** Variación del pH durante el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* en los medios MRS y MISSEL.

La soya constituye base para medios sintéticos, así se menciona a la Tripteína Soya Caldo; Medio adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. Además, la peptona de soya aporta carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos (U.S. Pharmacopeial Convention, Inc, 1999). Aunque, no se incluyó la totalidad del grano de soya se reporta la riqueza en materia orgánica del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (Hernández, 2017).

La valoración del consumo de jarabe de miel de azúcar morena, en los diferentes grupos del ensayo y a los diferentes momentos, permitió observar un ligero incremento durante el ensayo (28 d), aunque con alta variabilidad entre las colmenas. El mayor consumo lo alcanzó el grupo tratado con el sirope 125 g/L.

En todos los casos se utilizó en el ensayo el azúcar moreno, también llamado “negro” o “crudo”. Este azúcar contiene entre un 96 y un 98% de sacarosa y su color amarillento se debe al porcentaje de sacarosa que se le ha extraído y a una película de melaza que envuelve cada uno de sus cristales. (Galiano, 2012).

El apiario donde se desarrolló el ensayo no tenía hábito del consumo de alimento artificial y también disponían de áreas de zona floral donde podían volar a alimentarse las abejas. La densidad del sirope 125 g/L pudo favorecer el consumo al compararlo con el de 50% v/v, al existir en este una ligera cristalización en la salida del alimentador que pudo limitar la obtención del jarabe por las abejas.

Las abejas son los principales polinizadores de la agricultura. Como tal, a menudo son manejadas muy intensamente con el fin de garantizar que se desarrollen en ambientes poco productivos, o forzándolas lo máximo en épocas del año no adecuadas según su fisiologismo nutricional. Dentro de este

contexto, la alimentación suplementaria es un punto crítico. Actualmente existe un debate entre los apicultores comerciales en cuanto a qué tipo de alimento con carbohidratos es mejor para las abejas. Las mezclas de jarabe de maíz con gran concentración de fructosa son las más fáciles de usar y las más baratas para muchos países (Brian *et al.*, 2015), no así para Cuba donde se practica el uso de la sacarosa (azúcar morena 50% v/v) como la mezcla más empleada por los apicultores para el mantenimiento o estímulo a la postura.

En condiciones normales las abejas guardan o almacenan alimento para poder sobrevivir durante la época de escasez de polen y néctar. En el apiario utilizado en el ensayo no se cosechó la miel y esta pudo competir con el nivel de consumo del alimento artificial por las abejas de los diferentes grupos.

Marchelli y García (2010), mencionan que en el suministro del alimento se debe considerar la fortaleza de la colonia, la época del año y las condiciones de la vegetación que aporta néctar y polen de la región. En colonias débiles, si se alimenta en exceso, las abejas no terminan el alimento lo que ocasiona que se fermente y/o se formen mohos. La mayoría de las colmenas utilizadas en el ensayo de campo fueron valoradas como débiles, lo que pudo influir también en su consumo.

La proporción del azúcar en el jarabe es variable, algunos autores reportan una proporción de 30 – 50 % v/v de azúcar, aunque generalmente la más referida a nivel mundial es 50 % v/v (Medina-Flores *et al.*, 2018) y en ensayos de sirope inoculado con BAL 125 g/L (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Niveles de consumo de jarabe de sacarosa durante el ensayo por los diferentes grupos experimentales.

<b>Grupos experimentales</b>	<b>1ra Dosis</b>	<b>2da Dosis</b>	<b>3ra Dosis</b>	<b>4ta Dosis</b>
	<b>Consumo (ml)</b>	<b>Consumo (ml)</b>	<b>Consumo (ml)</b>	<b>Consumo (ml)</b>
<b>Grupo 1</b>	32.5 ± 38.4	123.7 ± 44.4	210 ± 168.3	150 ± 23.4

Grupos experimentales	1ra Dosis	2da Dosis	3ra Dosis	4ta Dosis
	Consumo (ml)	Consumo (ml)	Consumo (ml)	Consumo (ml)
<b>Grupo 2</b>	43.8 ± 34.73	27.5 ± 5	51 ± 30.4	151.2 ± 35.2
<b>Grupo 3</b>	42.5 ± 28.4	27.5 ± 5	45 ± 48.5	68.7 ± 64.8
<b>Significación (p &gt; 0.05)</b>	<b>0.888</b>	<b>1.00</b>	<b>0.111</b>	<b>0.414</b>

**Leyenda:** Media ± Error Estándar; **Grupo 1.** (Jarabe 125 g de sacarosa /Litro de aguas inoculado con las cepas de BAL), **Grupo 2** (Jarabe 50 % de sacarosa / 50 mL de aguas inoculado con las cepas de BAL), **Grupo 3** (Jarabe 50 % de sacarosa / 50 mL de aguas sin inocular con las cepas de BAL.)

El jarabe de azúcar siempre es preferido por los individuos debido a su similitud que presenta con el néctar que recoge la abeja de las flores. Se destaca también la importancia del consumo de jarabe de azúcar fundamentalmente por su digestibilidad, el pH del jarabe se encuentra entre 5.6 y 7.9 (Jaramillo y Lara, 2002), rango de pH al que se ajustó el jarabe administrado en el experimento. De igual manera, el jarabe de azúcar como estrategia de alimentación artificial es una buena fuente de nutrientes para las abejas durante la época crítica (Medina-Flores *et al.*, 2018).

Dentro de las principales enfermedades que afectan a las abejas se incluyen Varroosis, Acarapisosis y Nosemosis (Fiorella *et al.*, 2017), en el diagnóstico antes y después de la aplicación de la alimentación artificial inoculada con *Lactobacillus ssp.* se observó que el agente de mayor nivel de infestación fue la Varroosis y este patógeno disminuyó al final del experimento, viéndose favorecidos significativamente todos los grupos, incluyendo el control (Tabla 4). El análisis entre los grupos no mostró diferencias entre ellos (Tabla 5). Acarapisosis no se diagnosticó en ninguno de los momentos y Nosemosis se detectó con nivel de infestación débil a los 28 d en una de las colmenas del grupo control y en una del grupo de sirope 125 g/L

**Tabla 4:** Resultados de la tasa de infestación por *Varroa* ssp en las colmenas de los diferentes grupos experimentales al inicio y final del estudio.

Grupos	Primer día			28 días			p > 0.05
	Varroas	TA	TI	Varroas	TA	TI	
Control	57	401	14,2	20	567	3,5	0,000
125 g/L	50	440	11,36	30	701	4,3	0,000
50/50 v/v	44	381	11,55	17	594	2,9	0,000

Total de abejas (TA); Tasa de Infestación (TI)

**Tabla 5:** Comparación de la tasa de infestación por *Varroa* ssp. en las colmenas de los diferentes grupos experimentales al inicio y final del estudio. p > 0.05

Primer día		28 días	
Comparación de los grupos		Comparación de los grupos	
Control	0,108	Control	0,245
125 g/L		125 g/L	
Control	0,133	Control	0,260
50/50 v/v		50/50 v/v	
125 g/L	0,467	125 g/L	0,083
50/50 v/v		50/50 v/v	

Hoy día, las abejas están estresadas por diversos factores bióticos y abióticos que afectan su salud y productividad. Además de los agentes patógenos, los pesticidas y la falta de flores y sus implicaciones sobre la salud del insecto han

sido profundamente estudiadas (Goulson *et al.*, 2015; Porrini *et al.*, 2016), el cambio de clima, la pérdida del hábitat y las especies invasivas se constituyen en entes cruciales para la integridad de la colmena (Potts *et al.* 2010; Nieto *et al.*, 2014).

La utilización de BAL aisladas de abejas o su ambiente como probióticos en la alimentación puede tener efecto profiláctico ante condiciones estresantes y ayudar a la salud de las mismas (Mathialagan *et al.*, 2017).

Sabate *et al.*, 2012 utilizando como probiótico la cepa de *B. subtilis* subsp. *subtilis* Mori2 en alimentadores artificiales con sirope a 125 g/L y una concentración final de  $1 \times 10^5$  esporas/mL y frecuencia mensual (Mayo-Diciembre); encontró que el número de esporas de *Nosema* ssp y *Varroa* ssp se encontraban por debajo del grupo control.

Fiorella y col., 2017 evaluaron el efecto de la administración oral de metabolitos bacterianos producidos por *Lactobacillus johnsonii* AJ5 sobre parámetros nutricionales, el desarrollo de *N. ceranae* y el comportamiento de las colonias de *A. mellifera*. La prueba del campo mostró una tendencia a reducir la incidencia de *N. ceranae*.

Para valorar desde el punto de vista productivo el efecto del sirope inoculado con las cepas de BAL sobre el comportamiento de las colonias se tuvo en cuenta la fortaleza de las colonias que incluyó fundamentalmente las variables: Crías Abiertas, Crías Cerradas, Panales con Miel, Panales con Polen. No se observó diferencias significativas en ninguno de los grupos, mostrando solo tendencia positiva los panales con miel y panales con polen, si comparamos los grupos 125 g/L y 50 % v/v con el grupo control (Tabla 6).

Novicov *et al.*, 2016 comprobaron el impacto de *Lactobacillus salivarius* A3job, cepa asociada al intestino de las abejas, sobre la producción de miel en apiarios comerciales. Las colmenas fueron alimentadas una vez al mes con células viables del *Lactobacillus* a una concentración de  $1 \times 10^5$  cfu/mL y vehiculizadas en la alimentación artificial (125 g/l jarabe de sacarosa). Los



resultados fueron favorables, sugiriendo su empleo como alternativa para los apicultores por su efecto económico y en la producción de miel.

Sabate *et al.*, 2012 utilizando como probiótico la cepa de *B. subtilis* subsp. *subtilis* Mori2 inoculado en sirope a 125 g/L a una concentración final de  $1 \times 10^5$  esporas/mL con frecuencia mensual (Mayo-Diciembre); encontró dentro de las variables que favorecieron al grupo tratado; el número de celdas operculado, el mayor número de abejas obreras, 26% más que el control así como la cantidad de miel almacenada (+17%) y la reducción del número de esporas de *Nosema* ssp y *Varroa* ssp.

**Tabla 6:** Comportamiento de la fortaleza de las colonias al inicio y al final del experimento.

	Media de los grupos (Tiempo 0)			Media de los grupos (Tiempo: 28 días)		
	Grupo Control	Grupo 12.5%	Grupo 50:50	Grupo Control	Grupo 12.5%	Grupo 50:50
<b>Colmenas</b>	2-8-11-13	3-10-14-15	4-6-9-12	2-8-11-13	3-10-14-15	4-6-9-12
<b>Crías Abiertas</b>	3	3	3	3	3,75	1
<b>Crías Cerradas</b>	4	4	4	4,25	2,75	1,75
<b>Panales con Miel</b>	4	4	4	2,25	<b>4,75</b>	<b>4,5</b>
<b>Panales con Polen</b>	3	3	3	1,25	<b>2,25</b>	<b>2,75</b>

En estudio para comprobar el efecto de la administración oral de metabolitos bacterianos producidos por *Lactobacillus johnsonii* AJ5 sobre parámetros nutricionales y el comportamiento de las colonias de *A. mellifera* en prueba de

campo se demostró un incremento de población de colonias con el paso del tiempo. También se observó una tendencia decreciente del tejido grasa en las abejas en todas las colonias, pero no hubo cambios evidentes en el contenido de proteínas del abdomen al final de la prueba (Fiorella *et al.*, 2017).

Al evaluar formulas energéticas en la alimentación de abejas melíferas Brian *et al.*, (2015), no encontraron ningún efecto beneficioso en el grupo asociado con el tratamiento con probióticos. Además, no siempre la capacidad probiótica demostrada en pruebas de laboratorio tienen su reproducibilidad en condiciones de campo dada la influencia de múltiples variables que interactúan sobre las colmenas (Hubert *et al.*, 2017), situación de la que no estuvieron exenta las utilizadas en el ensayo experimental.

## Conclusiones

- No existieron diferencias significativas entre el crecimiento de *Lactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus rhamnosus* en los medios de cultivo MRS y MISSEL, pudiéndose utilizar este último como medio alternativo.
- No se observaron diferencias significativas en el nivel de consumo entre los grupos experimentales, demostrando que el inóculo no influye en la palatabilidad del jarabe.
- En todos los grupos de colmenas se observó una disminución en la tasa de infestación por *Varroa* sp.
- El jarabe inoculado con cepas de *Lactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus rhamnosus* solo mostró una tendencia positiva al compararlas con el control en los indicadores Panales con Miel y Panales con Polen.
- En el diseño utilizado en el ensayo in vivo en colmenas de abejas, no se comprobó efecto probiótico del jarabe (125 g/L y 50% v/v) inoculado con cepas de *Lactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus rhamnosus*.

**Recomendaciones:**

- Utilizar el medio MISSEL en la multiplicación de *Lactobacillus ssp.* para obtener masa bacteriana en condiciones de laboratorio.
- Repetir el ensayo utilizando colmenas que se encuentren en períodos de hambruna o que tengan hábitos de consumo de jarabe y se pueda elevar el número de replicas

## **Bibliografía:**

ACPA. Asociación Cubana de Producción Animal. Finquero. Fincas Diversificadas. Ed. ACPA. Cuba. p. 63-69. 2010.

Amaró-Balmaseda, M. A. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas aisladas del estómago e intestino de abejas (*Apis mellifera*). [Tesis Grado]. Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Sancti Spíritus "José Martí Pérez": Sancti Spíritus, Cuba; 2017.

Audisio and Sergio R. Ruffinengo. Effects of *Lactobacillus Johnsonii* AJ5 Metabolites on Nutrition, *Nosema Ceranae* Development and Performance of *Apis Mellifera* L. J. APIC. SCI. Vol. 61 No. 1 2017. Audisio, M.C. and Benítez-Ahrendts, M.R., 2011. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* bee gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes* 2: 29-34. Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger KH (2012) Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutr Metab (Lond)* 20:9–61. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-61>

Alberoni D, Baffoni L, Gaggia F, Ryan P, Murphy K, Ross RP, Biavati B, Stanton C, Di Gioia D (2015) Administration of lactobacilli and bifidobacteria on *Apis mellifera* L. beehives to increase health of the bee super-organism. In: *Microbial diversity 2015, the challenge of complexity*, Perugia, pp 107–108

Alippi AM, Reynaldi FJ (2006) Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J Invertebr Pathol* 91(3):141–146. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.002>

Allen MF, Ball BV, Underwood BA (1990) An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *J Invertebr Pathol* 55:439–440. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(90\)90090-S](https://doi.org/10.1016/0022-2011(90)90090-S).

Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Mott BM, DeGrandi-Hoffman G (2011) An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*).

Corby-Harris V (2014) Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8(12):e83125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>

Andrearczyk S, Kadhim MJ, Knaga S (2014) Influence of a probiotic on the mortality, sugar syrup ingestion and infection of honeybees with *Nosema* spp. under laboratory assessment. *Med Weter* 70:762–765

Arias MC, Sheppard WS (2005) Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 37(1):25–35. Epub 2005 Apr 19. Erratum in: 2006 Jul; 40(1):315.

Audisio MC, Benítez-Ahrendts MR (2011a) *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Benef Microbes* 2(1):29–34. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0024>

Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Iburguren C, Apella MC (2011b) Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res* 166(1):1–13.

Audisio MC, Sabaté DC, Benítez-Ahrendts MR (2015) Effect of CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. *Benef Microbes* 6(5):687–695.

Aydin L, Gulegen E, Cakmak I, Girisgin AO, Wells H (2006) Relation between *Nosema* and Chalkbrood diseases, and its implication for an apiary management model. *Bull Vet Inst Pul* 50(4):471.

Brian R Johnson, William Synk, W Cameron Jasper & Eric Müssen (2015) Effects of high fructose corn syrup and probiotics on growth rates of newly founded honey bee colonies, *Journal of Apicultural Research*, 53:1, 165-170, DOI: 10.3896/IBRA.1.53.1.18.

Baffoni L, Gaggia F, Alberoni D, Cabbri R, Nanetti A, Biavati B, Di Gioia D (2016) Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Benef Microbes* 7:45–51. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0085>

Bailey L (1983) *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honeybees (*Apis* spp.) *J Appl Bacteriol* 55:65–69

Bailey L, Ball BV (1991) *Honey bee pathology*, 2nd edn. Academic Press, London

Butler È, Alsterfjord M, Olofsson TC, Karlsson C, Malmström J, Vásquez A (2013) Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiol* 13:235. <https://doi.org/10.1186/1471-2181-13-235>

Cai J, Collins MD (1994) Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 44:365–367

Corby-Harris V, Maes P, Anderson KE (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. PLoS One 9(4):e95056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056>

Conceptualización del modelo económico y social cubano de desarrollo socialista. Plan nacional de desarrollo económico y social hasta 2030: propuesta de visión de la nación, ejes y sectores estratégicos. La Habana.

Corby-Harris V., Maes, P., Anderson, K. E., 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. PLOS ONE9 (4), e95056.<file:///F:/Todo/TESIS/Az%FAcar%20moreno%20o%20az%FAcar%20blanco,%20%BFmoda%20o%20realidad%20%20%20%20Cristina%20Galiano.htm>

De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge G, Chejanovsky N, Chen YP, Gauthier L, Genersch E, De GFD, Bibière M, Ryabov E, De Smet L, Van Der Steen JJM (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J Apicul Res 52(4):1. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>.

EFSA (European Food Safety Authority) (2017) Towards holistic approaches to the risk assessment of multiple stressors in bees. pp 1–76. ISBN: 978-92-9199-573-8. <https://doi.org/10.2805/53269>

Ellegaard KM, Tamarit D, Javelind E, Olofsson TC, Andersson SG, Vásquez A (2015) Extensive intra-phylo-type diversity in lactobacilli and bifidobacteria from the honeybee gut. BMC Genomics 16:284. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1476-6>

Fiorella G. De Piano, Matias Maggi, María C. Pellegrini, Noelia M. Cugnata, Nicolas Szawarski, Franco Buffa, Pedro Negri, Sandra R. Fuselli, Carina M. Flemming HC, Wingender J (2017) The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8:623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Forsgren E (2010) European foulbrood in honey bees. J Inv Pathol 103:5–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>

Forsgren E, Fries I (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Vet Parasitol 170(3–4):212–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>

Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int J Food Microbiol 141(1):S15–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031>

Galiano, C., 2012. Azúcar moreno o azúcar blanco ¿moda o realidad? (En línea). Consultado el 12 de diciembre del 2013.

Genersch E (2010) Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:87–97. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>

Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I (2006) 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

Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M (2009) *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40(2):117–123

Gilliam M, Valentine DK (1977) Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*: the genus *Bacillus*. *J Invertebr Pathol* 28(2):275–276

Gisder S, Genersch E (2015) Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. *PLoS One* 10(2):e0117200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117200>

Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M (2013) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One* 8(3):e58165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058165>

Goodwin RM, Taylor MA, McBrydie HM, Cox HM (2006) Drift of *Varroa destructor*-infested worker honey bees to neighbouring colonies. *J Apicult Res* 45(3):155–156  
Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347:1255957. doi:10.1126/science.1255957.

Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E (2008) Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *J Invertebr Pathol* 108(3):167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.006>

Hedtke SM, Blitzer EJ, Montgomery GA, Danforth BN (2015) Introduction of non-native pollinators can lead to trans-continental movement of bee-associated fungi. *PLoS One* 10(6):e0130560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130560>

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A (2008)



How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10(10):2659–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x>

Higes M, Martin-Hernandez R, Meana A (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41:375–392

Hernández, L. Menéndez, C. Pérez, E.R. Martínez, D. Alfonso, D. Trujillo, L.E. Ramírez, R. Sobrino, A. Mazola, Y. Musacchio, A. Pimentel, E. 2018. Fructooligosaccharides production by *Schedonorus arundinaceus* sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase constitutively expressed to high levels in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 266 (2018) 59–71.

Hernández, O. (2006). Inquietud en el sector apícola español. *Mundo Ganadero*, 20-22.

Hernández-Torres Y. Efecto de *Lactobacillus acidophylus* y *Streptococcus thermophylus* multiplicados en leche de soya sobre indicadores productivos y de salud en terneros. [Tesis Grado]. Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”: Sancti Spíritus, Cuba; 2017.

Hölldobler B, Wilson EO, Nelson MC (2009) Chapter 1: the construction of a superorganism. In: *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. W. W. Norton & Company, New York. pp 3–10 (522 pp)

Kwong WK, Moran NA (2013) Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order ‘Enterobacteriales’ of the Gammaproteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(6):2008–2018. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044875-0>

Lee H, Churey JJ, Worobo RW (2009) Isolation and characterization of a protective bacterial culture isolated from honey active against American Foulbrood disease. *FEMS Microbiol Lett* 296(1):39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01615.x>

López-Hurtado, B. S. A. 2014. Efecto de la alimentación artificial en el crecimiento poblacional de abejas (*Apis mellifera*) en la zona de Yurimaguas. Tesis. Presentada para optar el título profesional de: Ingeniero Zootecnista, Yurimaguas – Perú. 2014.

Maggi M, Negri P, Plischuk S, Szawarski N, De Piano F, De Feudis L, Eguaras M, Audisio C (2013) Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and

fumagillin efficiency. *Vet Microbiol* 167:474–483.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.030>

Martinson VG, Moy J, Moran NA (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microbiol* 78(8):2830–2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>

Medina-Flores, C.A. Guzmán-Novoa, E. Saldívar-Frausto, S. y Aguilera Soto J. 2018. Efecto de tres dietas energético-proteicas en la población de abejas y producción de miel en colonias de *Apis mellifera*. *Nova Scientia* N° 20, Vol. 10 (1), 2018. pp.: 1 – 12.

MINAG. (2013). Resolución 547/2013. Cuba.

Moore L, Kosut M (2013) *Buzz: urban beekeeping and the power of the bee*. New York University Press, New York. <http://www.jstor.org/stable/j.ctt9qfrd1>. ISBN: 9780814763063

Moran NA (2015) Genomics of the honey bee microbiome. *Curr Opin Insect Sci* 10:22–28. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.003>

Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Peng G, Kadowaki T (2013) Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environ Microbiol Rep* 5(1):74–77. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00385.x>

Moritz RFA, Southwick EE (1992) *Bees as superorganisms: an evolutionary reality*. Springer, Berlin

Mouches C, Bové JM, Albisetti J, Clark TB, Tully JG (1982) A spiroplasma of serogroup IV causes a May-disease-like disorder of honeybees in Southwestern France. *Microb Ecol* 8:387–399. <https://doi.org/10.1007/BF02010677>

Natalichio, R. (2008). La biodiversidad del planeta, en juego. Recuperado el 23 de 3 de 2018, de ECOPORTAL: <http://www.ecoport.net>

Nieto A, Roberts SPM, Kemp J, Rasmont P, Kuhlmann M, Criado GM, Biesmeijer JC, Bogusch P, Dathe HH, De la Rúa P, De Meulemeester T, Dehon M, Dewulf A, Ortiz-Sánchez FJ, Lhomme P, Pauly A, Potts SG, Praz C, Quaranta M, Radchenko VG, Scheuchl E, Smit J, Straka J, Terzo M, Tomozii B, Window J,

Novicov, M., Tejerina M., Benítez-Ahrendts, M.R., Audisio, M.C. 2016. Honey yield of different commercial apiaries treated with *Lactobacillus salivarius* A3iob, a new bee-probiotic strain. *Beneficial Microbes*: 9 (2) - Pages: 291 - 298

Olofsson TC, Vásquez A (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol* 57:356–363. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0>

Olofsson TC, Alsterfjord M, Nilson B, Butler E, Vásquez A (2014) *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(9):3109–3119. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059600-0>

Page RE Jr, Peng CY (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp Gerontol* 36(4–6):695–711

Pătruică S, Dumitrescu G, Stancu A, Bura M, Bănăţean Dunea I (2012) The effect of prebiotic and probiotic feed supplementation on the wax glands of worker bees (*Apis mellifera*). *J Anim Sci Biotech* 45:268–271

Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I (2007) *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38(6): 558–565

Plischuk S, Meeus I, Smagghe G, Lange CE (2011) *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Env Microbiol Rep* 3:565–568. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00261.x>

Porrini MP, Audisio MC, Sabaté DC, Ibarguren C, Medici SK, Sarlo EG, Garrido PM, Eguaras MJ (2010) Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitol Res* 107:381–388. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1875-1>

Ptaszyńska AA, Borsuk G, Mułenko W, Olszewski K (2013) Impact of ethanol on *Nosema* spp. infected bees. *Med Weter* 69:736–741

Ptaszyńska AA, Borsuk G, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, Małek W (2016) Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitol Res* 115:397–406. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4761-z>

Raffiudin R, Crozier RH (2007) Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution. *Mol Phylogenet Evol* 43(2):543–552

Regassa LB, Gasparich GE (2006) Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Front Biosci* 11:2983–3002

Rodrigues, Rocha, Gomez, Goodfellow, & Freitas. (2012). Lipolysis in probiotic and symbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 1414-1421.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B (2010) Biology and control of *Varroa destructor*. *J Inv Pathol* 103:96–119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

Sabaté DC, Cruz MS, Benítez-Ahrendts MR, Audisio MC (2012). Beneficial effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a honey-associated strain, on honeybee colony performance. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4:39–46. doi:10.1007/s12602-011-9089-0011-9089-0

Sabaté DC, Carrillo L, Audisio MC (2009) Inhibition of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Res Microbiol* 160(3):193–199. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.002>

Sabaté DC, Cruz MS, Benítez-Ahrendts MR, Audisio MC (2012) Beneficial effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2, a honey-associated strain, on honeybee colony performance. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4:39–46. <https://doi.org/10.1007/s12602-011-9089-0011-9089-0>

Tajabadi N, Mardan M, Mustafa S, Feizabadi F, Nateghi L, Rasti B, Abdul Manap MY (2012). *Weissella* sp. *Taj-Apis*, a novel lactic acid bacterium isolated from honey. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.10 (2): 263-267.

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., 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.

Vásquez A, Olofsson TC (2008) The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apicul Res* 48(3):189–195

Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC (2012) Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One* 7(3):e33188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>

Wallberg A, Han F, Wellhagen G, Dahle B, Kawata M, Haddad N, Simões ZL, Allsopp MH, Kandemir I, De la Rúa P, Pirk CW, Webster MT (2014) A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nat Genet* 46(10):1081–1088. <https://doi.org/10.1038/ng.3077>

Winston ML (1987) *The biology of the honey bee*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA

Yoshiyama M, Kimura K (2009) Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol* 102:91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005>

## Anexos



