

EFFECTOS DE ADITIVOS PROBIÓTICOS FRENTE A *Nosema ceranae*, UN PATÓGENO DE LAS ABEJAS

EFFECTS OF PROBIOTICS AGAINST *Nosema ceranae*, A BEE PATHOGEN

Rocío Pérez Galup (0009-0000-2090-1429), Universidad de Matanzas.
rocio.pgalup@est.umcc.cu

Resumen

La monografía tiene como objetivo valorar los resultados alcanzados en la literatura científica referente a los efectos de diferentes microorganismos utilizados con fines probióticos frente al microsporidio *Nosema ceranae* causante de la enfermedad conocida como nosemosis en abejas (*Apis mellifera* L.). Se realizó la búsqueda de diversos experimentos y bioensayos donde se demostrará la acción de los microorganismos del tracto digestivo de *Apis mellifera* para la obtención de un probiótico que mejore la salud de las abejas y sus indicadores productivos en sustitución de antibióticos como la fumagilina. Varios autores han demostrado que el uso de microorganismos del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Parasacharibacter*, *Bacillus* y *Pediococcus* tienen potencialidades para utilizarse como probióticos, ya que disminuyen la acción y el desarrollo de esporas del *Nosema ceranae* en *Apis mellifera*.

Palabras claves: abejas; *nosema ceranae*; patógeno; probióticos

Summary

The following monograph aims to assess the results reached in the scientific literature regarding the effects of different microorganisms used for probiotic purposes against the *Nosema ceranae* microsporidium that causes the disease known as nosemosis in bees (*Apis mellifera* L.). A search was carried out for various experiments and bioassays that demonstrated the action of microorganisms in the digestive tract of *Apis mellifera* to obtain a probiotic that improves the health of bees and their productive indicators to replace antibiotics such as fumarillin. Several authors have shown that the use of microorganisms of the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Parasacharibacter*, *Bacillus* and *Pediococcus* have the potential to be used as probiotics, since they reduce the action and development of spores of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*.

Key words: bees; *nosema ceranae*; pathogen; probiotics

Las abejas son consideradas tradicionalmente el grupo de polinizadores de cultivos más importante en todo el mundo (Klein *et al.*, 2007 y Danforth *et al.*, 2006 como citó Requier *et al.*, 2022). Su eficiencia polinizadora está relacionada, entre otras cosas, con: su dieta compuesta predominantemente de recursos derivados de flores (Requier, *et al.*, 2020 como citó Requier, *et al.*, 2022), sus cuerpos cubiertos de pelos ramificados, que permiten la unión y el transporte eficiente de los granos de polen y su fidelidad floral a una especie determinada durante el mismo viaje de búsqueda de alimento o incluso durante su vida (Michener, 2007 y Stavert *et al.*, 2016).

Además de su importancia como agente polinizador, la explotación de las abejas mellíferas permite obtener una amplia variedad de productos (Crane, 1990 como citó Branchiccela, 2020). La miel es el principal de estos productos y el más comercializado. Se trata de una sustancia azucarada producida a partir del néctar secretado por las flores con el fin de atraer a los polinizadores y asegurar la fecundación de la planta. El principal uso de la miel es su consumo como endulzante, pero también es utilizado por sus propiedades salutíferas (Bogdanov *et al.*, 2008 como citó Branchiccela, 2020). Por otro lado, las abejas son utilizadas también para la obtención del polen. El polen es el gameto masculino de las plantas y constituye una fuente de proteínas y micronutrientes para los organismos que lo consumen (Haydak, 1970; Brodschneider & Crailsheim, 2010 como citó Branchiccela, 2020). Además, es posible obtener a partir de las colmenas otros productos como propóleo, jalea real, apitoxina y cera (Crane, 1990 como citó Branchiccela, 2020).

La alimentación de las abejas (*Apis mellifera* L.) se basa en el consumo de miel y polen. La miel es la principal fuente de carbohidratos, siendo los principales glucosa y fructosa (Doner, 1977 como citó Branchiccela, 2020). La miel se obtiene a partir del néctar colectado por las abejas adultas de las flores, las cuales lo segregan con el fin de atraerlas y asegurar su polinización. Una vez colectado comienza el proceso de maduración del néctar, concentrando los azúcares por evaporación de su contenido de agua y mediante el agregado de enzimas por parte de las abejas como invertasa, diastasa y glucosa oxidasa (Doner, 1977; Nicolson & Human, 2008 como citó Branchiccela, 2020). Una vez en la colmena, el néctar es depositado en las celdas donde finaliza el proceso de evaporación hasta obtener el porcentaje de humedad final menor al 20% y la celda es cerrada con

un opérculo cuya composición impide el intercambio de humedad con el ambiente (Bogdanov, 2009 como citó Branchiccela, 2020).

Tradicionalmente las colonias de abejas mellíferas son alimentadas por los apicultores con el fin de suministrarles alimentos en épocas que lo requieren, ya que las reservas coloniales no son suficientes para cubrir sus necesidades, o para promover un mayor desarrollo colonial y lograr mejores rendimientos productivos. Dicha alimentación puede ser un sustituto o un suplemento nutricional. La diferencia entre ambos es que los suplementos poseen miel o polen como componentes, mientras que los sustitutos están compuestos únicamente por ingredientes externos a los encontrados naturalmente en las colmenas (Haydak, 1970 como citó Branchiccela, 2020). Con el fin de proveer a la colmena de carbohidratos, suelen suministrarse distintos sustitutos. El jarabe a base de azúcar de caña es el comúnmente utilizado, pero también suelen suministrarse preparaciones caseras o comerciales conteniendo azúcar de caña invertida o impalpable entre otros componentes. El jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS) también se utiliza y resulta más económico (Hanover & White, 1993 como citó Branchiccela, 2020).

Durante los últimos años se han reportado pérdidas de polinizadores y en particular de colonias de abejas mellíferas a nivel mundial (Carreck & Neumann, 2010; vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Brodschneider *et al.*, 2016; Steinhauer *et al.*, 2018 como citó Branchiccela, 2020). Los porcentajes de pérdidas de colonias varían según el año y país, llegando a valores de hasta el 32,5 % de pérdidas invernales en Alemania, o el 27 % en Estados Unidos. Estas pérdidas pueden ascender al 45 % en el año (Brodschneider *et al.*, 2016, 2018; Kulhanek *et al.*, 2017; Gray *et al.*, 2019 como citó Branchiccela, 2020). Se ha planteado que la desnutrición de las abejas asociada al aumento de áreas destinadas a monocultivos, la infección con múltiples plagas y patógenos, la intoxicación con pesticidas, problemas de la reina y el cambio climático, constituyen los principales factores asociados a esta reducción de las colonias (Potts *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2012; Steinhauer *et al.*, 2018 como citó Branchiccela, 2020).

El hongo *Nosema ceranae* es un parásito intracelular obligado que aparentemente se originó en la abeja asiática *Apis cerana* y se extendió a la abeja occidental, *Apis mellifera*. (Goblirsch, 2018 como se citó en Borges *et al.*, 2021). La infección por este parásito ocurre en el tracto alimentario y puede tener una serie de efectos perjudiciales sobre *Apis mellifera*, incluida la degeneración de las

glándulas hipofaríngeas (Martín-Hernández, 2018 como se citó en Borges *et al.*, 2021) y el epitelio del intestino medio, la reducción de la absorción de nutrientes, el aumento del estrés energético, (Dussaubat, 2012 y Martín-Hernández, 2011 como citó en Borges *et al.*, 2021) supresión de la apoptosis (Higes, 2013 como citó Borges *et al.*, 2021) inmunosupresión (Atúnez, 2009 y Chaimanee, 2012 como citó Borges *et al.*, 2021) inicio temprano del comportamiento de búsqueda de alimento, disminución de la localización u orientación (Dussaubat, 2013 y Lobo, 2014 como citó Borges *et al.*, 2021), así como la disminución de la esperanza de vida y de las reservas de alimentos en las colonias (Emsen, 2020 y Valizadeh, 2020 como citó Borges *et al.*, 2021).

Para protegerse contra los patógenos, los insectos forman un exoesqueleto quitinoso y una cutícula en el tracto intestinal. Esta cutícula no está presente en el intestino medio, en el que solo está presente una membrana peritrófica semipermeable que permite el paso de los patógenos (Orihel, 1975 y Invertebrate Immunity, 2021 como citó Marín-García *et al.*, 2022). Además, las abejas producen especies reactivas de oxígeno (ROS) con propiedades antimicrobianas (James *et al.*, 2012 como citó Marín-García *et al.*, 2022). Este mecanismo de defensa no es suficiente para impedir la infección por *Nosema ceranae*, ya que este microsporidio provoca una sobreexpresión de genes relacionados con la oxidación, lo que provoca estrés oxidativo y daños en las células intestinales por la producción de enzimas como la catalasa, la peroxidasa glutatión y la Stransferasa glutatión (Dussaubat *et al.*, 2013 como citó Marín-García *et al.*, 2022).

Por lo tanto, el objetivo de esta monografía se centra en la búsqueda de experimentos que demuestren que cepas de macroorganismos son beneficiosos para su utilización como probiótico ya que tienen la potencialidad de combatir enfermedades que atacan a las abejas mellíferas como es el caso de la nosemiosis provocada por *Nosema ceranae*.

La fumagilina es uno de los tratamientos mas comunes y se administra como tratamiento profiláctico o de control de este hongo (Williams *et al.*, 2008, como citó Marín-García *et al.*, 2022). Tanto *Nosema apis* como *Nosema ceranae* son sensibles a la fumagilina, una sustancia antimicrobiana producida por *Aspergillus fumigatus*, que reduce temporalmente la carga parasitaria y el riesgo de colapso (Higes *et al.*, 2008 y Huang *et al.*, 2015 como citó Marín-García *et al.*, 2022). Sin embargo, se demostró que el tamaño de las colonias tratadas y no tratadas era similar dos meses después del tratamiento, por lo que la probabilidad de sobrevivir al invierno no difiere entre ellas (Mendoza *et al.*,

2017 y Giacobino *et al.*, 2016 como citó Marín-García *et al.*, 2022). Por otro lado, la fumagilina parece alterar las proteínas estructurales y metabólicas de las abejas que son necesarias para el funcionamiento normal de las células. *Nosema ceranae* aparentemente se libera de los efectos supresores de fumagilina en concentraciones que impactan la fisiología de las abejas (Huang *et al.*, 2015 como citó Marín-García *et al.*, 2022).

Por lo tanto, el saneamiento de la colmena no es posible si quedan esporas en la miel, la cera o el polen (Vidal-Naquet, 2015 y Huang *et al.*, 2015 como citó Marín-García *et al.*, 2022). Además, después de más de cincuenta años de uso comercial, se pueden detectar residuos en los productos de la colmena (Nozal, *et al.*, 2008 como citó Marín-García, *et al.*, 2022) y existe la preocupación de que *Nosema ssp.* se está volviendo resistente a esta sustancia (Williams *et al.*, 2008, como citó Marín-García *et al.*, 2022).

Los probióticos son organismos vivos que se ingieren con el objetivo de alterar el microbiota intestinal. Al aumentar los microbios beneficiosos y reducir las especies patógenas, los probióticos pueden ayudar a prevenir o tratar la disbiosis producida por patógenos o antibióticos (Hamdi, 2011 como se citó en Borges *et al.*, 2021).

La administración oral de probióticos ha demostrado un efecto protector sobre el microbiota intestinal del huésped (Gismondo *et al.*, 1999). En modelos murinos, tanto las cepas probióticas bacterianas como las de levadura han manifestado su eficacia contra los parásitos intracelulares y han provocado una mejora en la salud del huésped (Alak *et al.*, 1997, 1999; Benyacoub *et al.*, 2005; Humen *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2008; Dinleyici *et al.*, 2011 como citó El Khoury *et al.*, 2018). En cuanto a las abejas melíferas, se ha descubierto que las bacterias intestinales endógenas pertenecientes a las familias Lactobacillaceae, Bifidobacteriaceae y Acetobacteraceae desempeñan un papel importante contra *Nosema ceranae* (Sabaté *et al.*, 2012; Audisio *et al.*, 2015; Baffoni *et al.*, 2016; Corby-Harris *et al.*, 2016 como citó El Khoury, *et al.*, 2018).

En una infección experimental *in vivo* por *Nosema ceranae* se demostró el efecto probiótico de dos cepas bacterianas del intestino de las abejas (*Parasacharibacter apium* (PC1 sp.) y *Bacillus* sp. (PC2 sp. (PC2)) y dos probióticos de amplio espectro (Bactocell® y Levucell SB®) Se probaron administraciones tanto curativas como profilácticas: abejas melíferas infectadas con *Nosema ceranae* y no infectadas. Para los cuatro candidatos a probióticos, se midieron aumentos

significativos en las probabilidades de supervivencia (20-30 %) después de dos semanas de tratamiento con la administración de 10^3 UFC/ml en jarabe de azúcar, tanto en tratamientos curativos como profilácticos tan eficientes y seguros como los probióticos de amplio espectro para aumentar la supervivencia en el contexto de la infección experimental con *Nosema ceranae*. Aprovechar las propiedades beneficiosas del microbiota del huésped es una vía prometedora para desarrollar estrategias curativas eficientes y sostenibles contra enfermedades oportunistas en las colonias de las abejas melíferas. (El Khoury *et al.*, 2018).

El probiótico comercial *Protexin Concentrate* de una sola cepa (*Enterococcus faecium*) se utilizó para determinar su efecto sobre la carga de esporas de *Nosema ceranae* y la supervivencia de las abejas melíferas. Las abejas mantenidas en jaulas fueron inoculadas con esporas de *Nosema ceranae* y se administraron tratamientos de dosis única en jarabe de azúcar. La cepa única *Protexin Concentrate* produjo un número de esporas reducido (59 %) sin afectar la mortalidad. Las abejas inoculadas con *Nosema ceranae* alimentadas con 2.50 mg/ml de concentrado de *Protexin* de una sola cepa, tuvo una supervivencia significativamente mayor que las abejas inoculadas y no inoculadas con *Nosema ceranae*. La cepa única de *Protexin Concentrate* es prometedora, ya que puede reducir la proliferación de *Nosema ceranae* y aumentar la supervivencia de las abejas infectadas incluso en comparación con las abejas sanas y no infectadas. (Borges, *et al.*, 2021).

Con el objetivo de desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos nativos capaz de mejorar la salud de las abejas melíferas se sembró el contenido intestinal de abejas melíferas provenientes de apiarios históricamente sanos en agar MRS y agar Rogosa. De los 151 aislamientos potencialmente probióticos obtenidos, se seleccionaron 65 al azar y se observó que 57 de ellos consiguieron inhibir el crecimiento de *Penibacillus larvae in vitro*. Por otro lado, algunos de estos aislamientos fueron capaces de sobrevivir a distintas condiciones de acidez y concentraciones de azúcar. Luego de identificar los aislamientos mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, se encontró que la mayoría correspondían a la especie *Lactobacillus kunkeei*. Sin embargo, mediante rep-PCR se observó una gran diversidad intraespecífica entre estos aislamientos. Posteriormente se pre-seleccionaron los 10 aislamientos que presentaron las características biotecnológicas más prometedoras para ser utilizados como probióticos y a continuación se realizó una mezcla con cuatro aislamientos identificados como *Lactobacillus*

kunkeei. Se observó que la administración oral de esta mezcla en condiciones de laboratorio no afectó la supervivencia de larvas, ni modificó la expresión de diferentes genes vinculados al sistema inmune, mientras que por otro lado consiguió disminuir el nivel de infección de *Nosema ceranae*. Los resultados obtenidos en esta tesis son favorables, y sugieren que esta mezcla de 4 aislamientos de *Lactobacillus kunkeei* podría ser empleada en las colmenas para mejorar la salud de las abejas melíferas (Arredondo *et al.*, 2018)

En ensayo con *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, aislado del tracto intestinal de abejas y seleccionado por su alta producción de ácido láctico, fue aplicado como monocultivo para comprobar el comportamiento fisiológico y productivo de las colonias. La cepa se administró durante tres meses en el sirope y se hallaron diferencias significativas en las áreas de crías abiertas y operculadas en el grupo tratado con respecto al control. Además, con relación al número inicial, se encontró mayor porcentaje de abejas en el grupo tratado (54 %) que en el control (18 %). Asimismo, la cosecha de miel fue mayor (40 y 19 %) para los grupos tratados con respecto al control, respectivamente (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011 como se citó en Hernández-García, *et al.*, 2021).

Con un esquema parecido, se empleó la cepa *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, (Audisio, 2017 como se citó en Hernández-García *et al.*, 2021) y se observaron resultados benéficos similares. Los recuentos de esporas de *Nosema spp.* y *Varroa spp.* en las colmenas tratadas fueron más bajos que en las del grupo control. Estos resultados en los apiarios experimentales indican que *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Mori2 favoreció el desempeño de las abejas. En primer lugar, porque el microorganismo estimuló la puesta de huevos de la reina, lo que se tradujo en un mayor número de abejas y, en consecuencia, más miel. En segundo lugar, porque redujo la prevalencia de dos enfermedades importantes de las abejas en todo el mundo: la nosemosis y la varroasis (Hernández-García, *et al.*, 2021).

Los suplementos microbianos en la dieta de las abejas melíferas pueden tener impactos positivos en la salud de las abejas y controlar la nosemosis. La alimentación de la abeja melífera con la bacteria intestinal endógena *Bacillus subtilis* redujo la enfermedad producida por *Nosema ceranae* (Sabaté, *et al.*, 2009 como citó Lorizzo, *et al.*, 2022). También se demostró que una surfactina, sintetizada por esta bacteria, reduce el desarrollo de *Nosema ceranae*, actuando ya sea por exposición directa a

esporas purificadas o incorporada en el sistema digestivo de la abeja (Porrini, *et al.*, 2010 como citó Lorizzo *et al.*, 2022).

Se descubrió que la cepa *Pediococcus acidilactici* (PA CNCM MA18/5 M) era un probiótico eficaz contra *Nosema ceranae*, ya que mejora significativamente la vida útil de las abejas melíferas infectadas (Peghaire *et al.*, 2020 como cito Lorizzo, *et al.*, 2022). Por su parte, el probiótico comercial Vetafarm (*Lactobacillus acidophilus*, *Lacobacillus delbruekii sub. bulgaricus*, *Lp. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*), además de reducir la proliferación de *Nosema ceranae*, aumenta la supervivencia de las abejas melíferas infectadas (Borges, *et al.*, 2021 como citó Lorizzo, 2022).

Según Kunat-Budzyńska *et al.* (2022) demostraron que la administración oral de metabolitos bacterianos producidos por las cepas *Lactobacillus johnsonii* y *Lacobacillus kunkeei* no tuvo un efecto tóxico en las abejas; sin embargo, redujo el nivel de nosemosis (Fiorella *et al.*, 2017 y Arredondo *et al.*, 2018 como citó Kunat-Budzyńska *et al.*, 2022). Los primeros experimentos de laboratorio utilizando bacterias intestinales aisladas de los intestinos de abejas sanas, es decir, bifidobacterias y lactobacilos, fueron llevados a cabo por Baffoni *et al.* (2016) como citó Kunat-Budzyńska *et al.* (2022). Estos investigadores refieren que los ácidos orgánicos producidos por *Lactobacillus johnsonii* CRL 1647 tuvieron un efecto positivo en las colonias de abejas y redujeron el desarrollo de la nosemosis.

La administración *in vitro* de sobrenadantes libres de células de *Lactobacillus johnsonii* que contienen principalmente ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido feniláctico y ácido acético no causó mortalidad de abejas incluso con una dosis alta de 60 µL/abeja (Maggie *et al.*, 2013 como citó Kunat-Budzyńska *et al.*, 2022). También se pueden emplear metabolitos como bactericina y surfactina, derivados de cepas de *Bacillus*, los cuales inhibieron el desarrollo de la nosemosis (Porrini *et al.*, 2010 como citó Kunat-Budzyńska *et al.*, 2022).

La investigación realizada por Garrido *et al.* (2023) tuvo como objetivo brindar nuevos conocimientos sobre el efecto de la administración de cepas bacterianas seleccionadas, aisladas del intestino de abejas y una mezcla de extractos de plantas comerciales (*HiveAlive*®) en *Nosema ceranae*. Los análisis se realizaron primero en condiciones de laboratorio con diferentes dosis infectivas de *Nosema ceranae*, el efecto de cepas individuales y sus mezclas y la influencia de la administración

de polen. Se registró la tasa de supervivencia diaria y el consumo de alimento y se analizó el desarrollo de patógenos mediante PCR y recuentos microscópicos. También se evaluaron biomarcadores de inmunidad y el estado fisiológico para los diferentes tratamientos probados utilizando una cepa bacteriana, una mezcla de todas las bacterias y una mezcla de extractos de plantas como tratamientos. Los resultados mostraron un aumento de los niveles de transcripción de abaecina en el intestino medio de las abejas melíferas tratadas con la mezcla bacteriana y un aumento de la expresión de la proteína vitelogenina en la hemolinfa de las abejas tratadas con dos cepas bacterianas separadas (*Bifidobacterium coryneforme* y *Apilactobacillus kunkeei*). La mezcla bacteriana y la mezcla de extractos de plantas demostraron una eficacia significativa en la reducción de *Nosema ceranae* independientemente de la composición de la dieta. La eficacia antiparasitaria de los tratamientos en condiciones de campo se estudió mediante un enfoque de semicampo que se adaptó por primera vez de investigaciones sobre insecticidas, para analizar la actividad antiparasitaria contra *Nosema ceranae*. El enfoque demostró ser confiable y eficaz para validar los datos obtenidos en el laboratorio.

Los microorganismos que presentaron características para ser utilizados como probióticos fueron los del género *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Parasacharibacter*, *Bacillus* y *Pediococcus*. Siendo estos los que demostraron que bajo diferentes condiciones y en cantidades adecuadas reducen el número de esporas del hongo *Nosema ceranae*. La obtención de probióticos a base de estos microorganismos mejorará a gran escala la salud de las colmenas infectadas por el microsporidio intracelular *Nosema ceranae*.

A partir del análisis de estos resultados se constata que el uso de probióticos en la alimentación de las abejas tiene potencial para mejorar el control o prevención del hongo *Nosema ceranae*, agente causal de la nosemosis, que tantas pérdidas provoca en la apicultura moderna.

Referencias bibliográficas

- Arredondo, D., Castelli, L., Porrini, M. P., Garrido, P. M., Eguaras, M. J., Zunino, P., & Antúnez, K. (2018). *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Beneficial microbes*, 9(2), 279–290. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0075>

- Borges, D., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2021). Effects of Prebiotics and Probiotics on Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with the Microsporidian Parasite *Nosema ceranae*. *Microorganisms*, 9(3), 481. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030481>
- Branchiccela, M. B. (2020). Rol de la nutrición de la abeja *Apis mellifera* en la infección con los patógenos de mayor importancia apícola. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.
- El Khoury, S., Rousseau, A., Lecoer, A., Cheaib, B., Bouslama, S., Mercier, P. L., ... & Derome, N. (2018). Deleterious Interaction Between Honey bees (*Apis mellifera*) and its Microsporidian Intracellular Parasite *Nosema ceranae* Was Mitigated by Administrating Either Endogenous or Allochthonous Gut Microbiota Strains. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6, 58. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00058>
- Garrido, P. M., Porrini, M. P., Alberoni, D., Baffoni, L., Scott, D., Mifsud, D., Eguaras, M. J., & Di Gioia, D. (2023). Beneficial Bacteria and Plant Extracts Promote Honey Bee Health and Reduce *Nosema ceranae* Infection. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10.1007/s12602-022-10025-7. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-10025-7>
- Hernández-García, J. E., & Díaz, J. A. R. (2021). Potentialities of the utilization of zootechnical additives in Cuban apiculture. *Pastos y Forrajes*, 44. ISSN 2078-8452
- Hidalgo Gómez, R. M. (2018). Efecto de la ingestión de jarabe inoculado con *Lactobacillus* ssp en abejas confinadas en condiciones de laboratorio. Doctoral dissertation, Universidad de Sancti Spíritus“ José Martí Pérez, Cuba.
- Kunat-Budzyńska, M., Budzyński, M., Schulz, M., Strachecka, A., Gancarz, M., Rusinek, R., & Ptaszyńska, A. A. (2022). Natural Substances, Probiotics, and Synthetic Agents in the Treatment and Prevention of Honeybee Nosemosis. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1269. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111269>
- Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., Di Criscio, D., & De Cristofaro, A. (2022). Functional Properties and Antimicrobial Activity from Lactic Acid Bacteria as Resources to Improve the Health and Welfare of Honey Bees. *Insects*, 13(3), 308. <https://doi.org/10.3390/insects13030308>

- Marín-García, P. J., Peyre, Y., Ahuir-Baraja, A. E., Garijo, M. M., & Llobat, L. (2022). The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. *Veterinary sciences*, 9(3), 130. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030130>
- Requier, F., Pérez-Méndez, N., Andersson, G. K. S., Blareau, E., Merle, I., & Garibaldi, L. A. (2023). Bee and non-bee pollinator importance for local food security. *Trends in ecology & evolution*, 38(2), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.10.006>