

EFFECTOS DE PROBIOTICOS FRENTE A *Paenibacillus larvae* EN ABEJAS

EFFECT OF PROBIOTICS AGAINST *Paenibacillus larvae* IN BEES

Ana Karla López Ojeda (0009-0000-4566-2938), Universidad de Matanzas

anakarlalopezojeda@gmail.com

Resumen

Las abejas son de gran importancia para la economía del país, proporcionan diversos productos como miel y jalea real, además son agentes polinizadores por excelencia. *Paenibacillus larvae*, es el agente causal de la loque americana, importante enfermedad larvaria que ataca a las abejas y ocasiona la muerte de la cría. El presente trabajo tuvo como objetivo valorar los resultados del efecto de los probióticos frente a *Paenibacillus larvae* en las abejas. Se constató que estos microorganismos benéficos provocan cambios en la dinámica de la población microbiana intestinal, disminuyen el crecimiento de patógenos, incrementan la microbiota beneficiosa, modulan la respuesta inmune del hospedero, mejoran de la digestión y la absorción de nutrientes. Se comprobó que cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Pediococcus* manifiestan actividad antimicrobiana ante *Paenibacillus larvae*, por lo que tienen potencial como biocontroladores de esta enfermedad, causante de la pérdida de las colonias de abejas.

Palabras clave: abejas; patógenos de abejas; probióticos

Summary

Bees are of great importance for the country's economy, they provide various products such as honey and royal jelly, and they are pollinating agents par excellence. *Paenibacillus larvae* is the causal agent of American foulbrood, an important larval disease that attacks bees and causes the death of the brood. The objective of this work was to evaluate the results of the effect of probiotics against *Paenibacillus larvae* in bees. It was found that these beneficial microorganisms cause changes in the dynamics of the intestinal microbial population, reduce the growth of pathogens, increase the beneficial microbiota, modulate the host's immune response, and improve digestion and nutrient absorption. It was proven that strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* and *Pediococcus* manifest antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, so they have potential as biocontrollers of this disease, which causes the loss of bee colonies.

Keywords: bees; bee pathogens; probiotics

Las abejas tienen gran repercusión tanto para la vida humana como para la del planeta. Si las abejas desaparecieran por completo, el impacto en los bosques sería brutal, gracias a la polinización, se favorece la riqueza y variabilidad genética en las plantas. Por todo ello, son imprescindibles para el mantenimiento de los ecosistemas (García-Carrasco, 2022). La polinización es el proceso por el cual el polen es transferido desde el estambre (órgano masculino de la flor) hasta el estigma (órgano femenino de la flor). De esta forma, se produce la fecundación de los óvulos de la flor, permitiendo la formación de frutos y semillas (Carvajal, 2020).

La producción de miel es un renglón importante para la economía del país, ya que se conocen todos los beneficios que trae y es uno de los principales productos de exportación. Según Cauch et al. (2015), la importancia de este alimento se debe a los beneficios terapéuticos, profilácticos, cosméticos, nutracéuticos, oxidantes, anticancerígenos, cardioprotectores, antibacterianos, respiratorios, dermatológicos, gastrointestinales, ginecológicos y nutricionales, todo debido a la composición química y a las propiedades fisicoquímicas de la miel. La miel, debido a su efecto protector contra el estrés oxidativo, surge como una alternativa apropiada para realizar tratamientos en úlceras, quemaduras y heridas (Cruz et al., 2014 como se citó por Campo, 2023).

A pesar de todos los beneficios que traen consigo las abejas, se ven afectadas por diferentes factores como puede ser el mal manejo del hombre con el uso de productos químicos, el medio ambiente o agentes patógenos que pueden ser bacterias, hongos, virus, ácaros.

Entre estos se encuentra *Paenibacillus larvae*, que es un entomopatógeno bacteriano formador de esporas y agente causal de la importante enfermedad larvaria loque americana (AFB), la cual ataca a las crías de abejas melíferas. Las infecciones activas de las larvas por células vegetativas de *Paenibacillus* suelen ser mortales, altamente transmisibles e incurables para las colonias, pero, cuando están inactivas, la forma de esporas de este patógeno puede persistir asintómicamente durante años (Daisley et al., 2022).

Según Baker (1970) y Bruno (1999) citados por Borracci et al. (2004), *Paenibacillus Larvae* es una bacteria flagelada de 2,5 a 5 μ de largo y 0,4 a 0,8 μ de ancho. Su característica principal es la de formar endosporas muy resistentes. Estas últimas al poseer doble pared se pueden detectar con coloraciones clásicas para esporas, como la de Shaeffer y Fulton. Al observarlas sin coloración con el microscopio de contraste de fase, estas presentan el clásico movimiento browniano. Estas esporas tienen tolerancia a muy altas temperaturas, resisten 30 minutos a

100°C y 15 minutos a 120°C. Resisten la acción de desinfectantes químicos como el cloro, productos basados en yodo y radiación ultravioleta durante 20 minutos de exposición. Además, de acuerdo a las condiciones de conservación, pueden sobrevivir en el ambiente por largo tiempo, y luego de 30 años comienzan a presentar una disminución de la viabilidad.

Borracci *et al.* (2004) refirieron que las esporas son infectivas y responsables del inicio del ciclo de la enfermedad una vez que las larvas ingieren o consumen alimento contaminado con las mismas. Las abejas nodrizas pueden albergar a las esporas tanto sobre la superficie corporal como dentro de su tracto digestivo. De este modo, al alimentar a las larvas, las nodrizas portadoras transmiten oralmente la infección o inclusive lo hacen indirectamente contaminando a la celda. Una vez dentro del intestino de la larva, las esporas germinan después de un período variable que fluctúa entre las 24 y 48 horas, originándose así las formas vegetativas. Estos bacilos flagelados se reproducen y desarrollan dentro del tracto digestivo de la larva. Cuando la larva pasa al siguiente estadio, durante el desarrollo de la pre-pupa, estos bacilos penetran activamente la membrana peritrófica y la pared intestinal, produciendo la invasión bacteriana de la hemolinfa. A partir de ese momento la bacteria sigue desarrollándose y reproduciéndose rápidamente, ocasionando la muerte de la cría por septicemia generalizada. La muerte puede ocurrir en el estado de prepupa o pupa y luego de transcurridos varios días la larva se deseca y adquiere un color negro. En esta etapa se denomina “escama” y tiene un alto poder infectivo.

La loque americana se puede identificar claramente observando los marcos de cría de los panales afectados. Estos marcos cuando están infectados por *P. larvae*, presentan una distribución irregular. Así, se pueden detectar celdas infectadas y sanas en el mismo panal. De acuerdo con el grado de infección que presenten la visualización suele presentar un aspecto de mosaico, o sea la presencia de celdas afectadas intercaladas con otras sanas, lo que a campo se describe como panales de “aspecto salteado”. De este modo, cuando se observan con mayor detenimiento, algunas de las celdas se encuentran con crías vivas mezcladas con otras muertas, algunos opérculos hundidos y otros de aspecto grasiento, pudiendo también observarse perforaciones irregulares debido a la limpieza sanitaria parcial que efectúan las mismas abejas. La cría muere una vez finalizada su etapa larval. Va cambiando de color y consistencia, primero desde el pardo amarillento, luego un pardo oscuro y por último un negro pardusco; durante este cambio de coloración la larva se va achicando, deformando y finalmente se adhiere hacia uno de los lados de la celda, hasta adquirir el aspecto de una costra (Borracci *et al.*, 2004).

Las abejas melíferas son los polinizadores de cultivos más importantes en todo el mundo y durante las últimas décadas se ha utilizado principalmente un solo antibiótico para protegerlas de la loque americana (AFB), una enfermedad larvaria letal causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. La oxitetraciclina (OTC) es el único antibiótico profiláctico aprobado para la infección por *P. larvae* en Canadá, que ha desencadenado cepas resistentes. Si bien sólo las primeras etapas larvarias son vulnerables a la BAAR, las consecuencias son letales. Los primeros estudios de microbiología, genómica y proteómica han identificado diferencias moleculares entre las etapas de las abejas melíferas resistentes a los BAAR y las larvas vulnerables. Los perfiles de los factores inmunológicos, como los péptidos antimicrobianos (AMP), y una comunidad característica de bacterias intestinales comensales (CGB), son diferencias clave (Romero Guzmán, 2020).

Cuando se detecta en un apiario se realiza la quema de las colmenas infectadas, lo que significa una pérdida económica y daños para el medio ambiente. Por esto se investiga el uso de aditivos frente a este tipo de patógeno.

En la producción pecuaria con fines comerciales, es frecuente el uso de aditivos para aumentar la efectividad de los nutrientes presentes en el alimento, su disponibilidad y absorción en el tubo digestivo, además de modular la biota intestinal de los animales y promover su crecimiento. Entre los productos usados como aditivos en alimentos para animales, están antibióticos, probióticos, oligosacáridos, enzimas, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales, entre otros. El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la producción pecuaria, se ha asociado con un aumento en la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, ya que se usan en dosis menores a las necesarias para eliminar toda la población bacteriana y quedan algunas bacterias que logran resistir. Estas logran reproducirse, lo que contribuye a la multiplicación de genes de resistencia y su diseminación mediante transferencia horizontal hacia diferentes especies bacterianas, tanto patógenas como comensales, dentro del tubo digestivo del animal. De ahí que la Unión Europea ha prohibido el uso de antibióticos como aditivos en alimentos para animales desde el 2006. Por su parte la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, prohibió a partir de enero del 2017 el uso de antibióticos (exceptuando coccidiostatos) como promotores de crecimiento animal (Dutil *et al.*, 2010; Carattoli, 2013; Yirga, 2015 como se citó por Molina, 2019).

Esto ha fomentado la búsqueda de otros productos alternativos para usarlos como promotores del crecimiento y de la salud en animales productivos. Entre las alternativas que se han venido

utilizando en alimentación animal, están los probióticos. Estos son definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como organismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero (Molina, 2019).

Según Molina (2019) los microorganismos deben reunir ciertas características para ser usados como probióticos en nutrición animal. No deben ser patógenos para los animales, deben ser resistentes a factores físicos y ambientales propios de los procesos de elaboración de alimentos para animales. Deben mantener su viabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y manejo, además de ser capaces de resistir el ambiente del tubo digestivo, adherirse a la pared intestinal y colonizar el tubo digestivo del animal. Estos microorganismos deben tener la capacidad de crecer rápidamente en medios de cultivo de bajo costo, para que su producción y uso en nutrición animal sea rentable. Debido a esto, el uso de bacterias formadoras de esporas altamente resistentes a condiciones ambientales adversas como altas temperaturas y desecación, particularmente pertenecientes al género *Bacillus*, son cada vez más frecuentes.

Molina (2019) reportó que los mecanismos de los probióticos consisten en: cambiar la dinámica de la población microbiana, disminuir el crecimiento de microorganismos patógenos y promover el crecimiento de microflora, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero, tanto la respuesta innata como la respuesta adaptativa, aumento en la digestión y absorción de nutrientes. Por esto el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de probióticos frente al patógeno de las abejas *Penibacillus larvae*.

Rodríguez *et al.* (2021) caracterizó *in vitro* bacterias ácido lácticas (*Fructobacillus fructosus* SS66, *Lactococcus garvieae* SS79, *Fructobacillus fructosus* SS72, *Lactobacillus kunkeei* SS70, *Lactobacillus rhamnosus* SS73), aisladas del tracto digestivo de abejas *Apis mellifera*. Se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas enzimáticas, estabilidad de crecimiento a diferentes temperaturas (37 y 45°C) y a un rango de pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5), tolerancia a jugo gástrico artificial (JGA), sales biliares (0,3, 05 y 1 %); pruebas de adherencia como agregación, autoagregación e hidrofobicidad y antagonismo microbiano. Los resultados mostraron que todas las cepas crecieron a 37°C a pH ácido 6,5 y 5,5; no crecieron a pH 4,5, produjeron peróxido de hidrógeno y no revelaron actividad hemolítica. Las cepas soportaron el JGA pH 3 durante 3 h a 37°C y a las sales biliares hasta 1 %. Ninguna cepa mostró poder de autoagregación Todos los aislados presentaron amplio espectro de actividad antimicrobiana y efecto inhibitorio frente a *Paenibacillus larvae* y otros patógenos humanos y animales.

Vázquez *et al.* (2021) analizaron las propiedades de los quitosanos en larvas de *Apis mellifera* como protector frente a la infección por *Paenibacillus larvae*. Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* ejercida por el quitosano de alto peso molecular (PM 1250 kD) en tres cepas de la bacteria *Paenibacillus larvae* (L33, N15 y Típica) mediante la técnica de dilución seriada en caldo MYT. Se obtuvieron porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano mayores al 50 por ciento para las concentraciones entre 250 y 63 ppm, dependiendo de la cepa. Se evaluó la supervivencia de las larvas *in vitro* para concentraciones crecientes de quitosano de alto PM incluidos en la dieta. Las curvas de supervivencia control y tratadas con 1000, 750, 500, 250 y 100 ppm no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, se observaron cambios en el desarrollo larval en función de la dosis aplicada de quitosanos. En larvas L7, alimentadas con concentraciones de 250 y 100 ppm de quitosano, se observó un aumento respecto al control del 20 y 25 % respectivamente, de individuos de tamaño mayor a 45 mm. La baja toxicidad larval junto con la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *P. larvae* muestran potencial del uso de los quitosanos de alto PM para el tratamiento de la loque americana.

Castellanos (2019) desarrolló un trabajo que tuvo como objetivo principal diseñar un modelo larval, para bioensayos de abejas *Apis mellifera* en condiciones de Cuba, que permitía evaluar los efectos de *Lactobacillus* spp frente a *Paenibacillus larvae* y otros patógenos que atacan a las abejas. Se enfrentaron inicialmente las cepas de *Lactobacillus kunkeei* (Cepa SS 70) y *Lactobacillus rhamnosus* (Cepa SS 73), que son microorganismos prospectos a probióticos, frente al patógeno de las abejas *Paenibacillus larvae* en condiciones de laboratorio mediante el método mota en placa y resultaron ser efectivas. También se observó que los microorganismos para el modelo larval crecieron todos en la dilución 10^{-6} y se ajustó en el caso de *Lactobacillus* a una concentración en el alimento de 10^4 células/microlitros de alimento y en el caso de *P. larvae* a 10^3 esporas/microlitros de alimento.

Cabana *et al.* (2021) aislaron bacterias lácticas del intestino de abejas *Scaptotrigona jujuyensis* y evaluaron su efecto inhibitorio *in vitro* sobre *P. larvae*. Se tomaron muestras de *S. jujuyensis* que fueron mantenidas en agua peptonada estéril hasta su procesamiento. Este consistió en la extracción de los intestinos, que fueron macerados y enriquecidos en caldo MRS por 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Transcurrido ese tiempo, se sembraron en medio agar MRS e incubaron bajo las mismas condiciones. Posteriormente se procedió a seleccionar aquellas colonias con características fenotípicas compatibles con el género *Lactobacillus*, las cuales fueron colocadas en caldo MRS hasta lograr una concentración de 10^8 UFC/ mL. *P. larvae* UB-

CIDEFI fue activado en caldo MYPGP a 37 °C. Para el ensayo de inhibición se empleó la técnica de difusión en placa, con agar Mueller Hinton, en el cual se sembraron 100 µl de *P. larvae* y se realizaron pocillos, donde se adicionaron 20 µL de las bacterias lácticas. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h, transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición. Se obtuvieron cinco cepas del intestino de las abejas, denominadas: M1, M2, M3, M4 y M5. Estas presentaron halos de inhibición promedio de: M1 (2,75±0,5 mm), M2 (8±0,81 mm), M3 (12,5 ±1,63 mm), mientras que M4 y M5 no registraron halos de inhibición. Se realizó ANOVA estableciendo una diferencia significativa entre las cepas con un p valor < 0,0001. La cepa láctica M3 presentó el mejor efecto inhibitorio *in vitro* sobre *P. larvae*, postulándose como una posible opción para prevenir y controlar la loque americana.

Añón (2018) estudió la acción de un probiótico compuesto por cuatro cepas diferentes de *L. kunkeei* sobre los principales patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay en colmenas de producción. Las características de estas cepas se examinaron previamente, se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, la capacidad de sobrevivir en distintas concentraciones de acidez, temperatura y azúcar. La administración de estas cepas fue segura para larvas y abejas adultas en condiciones controladas de laboratorio. Por otro lado, el probiótico consiguió disminuir la mortalidad ocasionada por *P. larvae* en larvas y disminuir el número de esporas de *N. ceranae* en abejas adultas.

Rovey (2022) determinaron la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM) del extracto hexánico de *Achyrocline satureioides*, obteniendo valores de 0,30 µg/ml y 1,17 µg/ml, respectivamente. Se determinaron los parámetros de crecimiento de *P. larvae* 9 (ERIC I) y luego se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del extracto hexánico (sub-inhibitoria, inhibitoria, sub-bactericida y bactericida) sobre el crecimiento bacteriano. El extracto hexánico mostró un buen efecto inhibitorio, independientemente de las concentraciones evaluadas. El crecimiento bacteriano fue afectado significativamente a concentraciones sub-bactericidas y bactericidas. Estos resultados demostraron la efectividad del extracto hexánico de *A. satureioides* sobre *P. larvae*, constituyendo una alternativa prometedora para el control de loque americana.

Forsgren *et al.* (2010) evaluaron los efectos antagónicos de las bacterias del ácido láctico (BAL) de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, originadas en el estómago de la miel, sobre el patógeno de las abejas melíferas, *Paenibacillus larvae*. Estos autores utilizaron ensayos de inhibición en placas de agar y bioensayos de larvas de abejas melíferas para investigar los

efectos de las BAL de abejas melíferas en el crecimiento de *P. larvae in vitro* y en la infección por AFB *in vivo*. Los filotipos de LAB individuales mostraron diferentes propiedades de inhibición contra el crecimiento de *P. larvae* en placas de agar, mientras que una combinación de los once filotipos de LAB provocaron la inhibición total (sin crecimiento visible) de *P. larvae*. Agregar la mezcla de LAB al alimento para larvas redujo significativamente la cantidad de larvas infectadas con BAAR en los bioensayos de exposición. Los resultados demuestran que las BAL específicas de las abejas poseen propiedades beneficiosas para la salud de las abejas.

Al-Ghamdi (2018) evaluaron los efectos probióticos de siete bacterias intestinales aisladas de las abejas melíferas autóctonas de Arabia Saudita. Se utilizaron bioensayos *in vivo* para investigar los efectos de cada bacteria intestinal, a saber, *Fructobacillus fructosus* (T1), *Proteus mirabilis* (T2), *Bacillus licheniformis* (T3), *Lactobacillus kunkeei* (T4), *Bacillus subtilis* (T5), *Enterobacter kobei* (T6). y *Morganella morganii* (T7) en el porcentaje de mortalidad de larvas de abejas melíferas infectadas con esporas de *P. larvae* junto con un control negativo (dieta normal) y un control positivo (dieta normal enriquecida con esporas de *P. larvae*). La adición de bacterias intestinales a la dieta normal redujo significativamente el porcentaje de mortalidad de los grupos tratados. El porcentaje de mortalidad en todos los grupos tratados osciló entre 56,67 % y 86,67 %. El grupo tratado con T6 presentó la mayor mortalidad (86,67 %), mientras que el grupo T4 mostró la mortalidad más baja (56,67 %). Entre los siete tratamientos bacterianos intestinales, T4 y T3 disminuyeron la mortalidad en un 56,67 % y 66,67 % respectivamente, mientras que para T2, T6 y T7 el porcentaje de mortalidad fue igual al del control positivo (86,67 %). Los porcentajes de mortalidad en los grupos de larvas infectadas tratados con T1 y T5 fueron 78,33 % y 73,33 % respectivamente. La mayor parte de la mortalidad ocurrió en las larvas tratadas durante los días 2 y 3. Los tratamientos T3 y T4 mostraron efectos positivos y redujeron la mortalidad.

Truong *et al.* (2023) identificaron 20 cepas del género *Lactobacillus* con propiedades antimicrobianas contra *P. larvae*. Se evaluaron tres cepas representativas de diferentes especies (*L. apis* HSY8_B25, *L. panisapium* PKH2_L3 y *L. melliventris* HSY3_B5) como posibles candidatos a probióticos y se seleccionaron debido a su capacidad de prevenir la BAAR.

Daisley *et al.* (2020) realizaron experimentos *in vitro* donde utilizaron larvas de abejas criadas en laboratorio con la aplicación de *Lactobacillus plantarum* Lp39, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus kunkeei* BR-1 (contenidos en BioPatty) redujeron la carga de patógenos, regularon positivamente la expresión de genes inmunes clave y mejoraron la supervivencia durante la

infección por *P. larvae*. Estos hallazgos sugieren que el uso de un suplemento para colmenas que contenga lactobacilos, que es práctico y asequible para los apicultores, puede ser eficaz para reducir las pérdidas de colmenas relacionadas con patógenos enzoóticos.

El objetivo del estudio fue aislar e identificar las bacterias intestinales de *Apis mellifera* y evaluar el efecto antagonista contra *Paenibacillus larvae*, que causa la loque americana (AFB) en las abejas. El método de dilución en placas se utilizó para la cuantificación de grupos microbianos seleccionados del tracto digestivo de las abejas, con énfasis en las bacterias de los intestinos de las abejas. Las bacterias se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS Biotyper). En total, se identificaron cinco clases, 27 géneros y 66 especies de bacterias. Los géneros *Lactobacillus* (10 especies) y *Bacillus* (8 especies) fueron los más abundantes. Las bacterias Gram negativas estuvieron representadas con 16 géneros, mientras que las Gram positivas con 10 géneros. *Delftia acidovorans* y *Escherichia coli* fueron las más abundantes en el tracto digestivo de las abejas melíferas. *Lactobacillus* spp., especialmente *L. kunkeei*, *L. crispatus* y *L. acidophilus*. Mostraron una fuerte actividad antimicrobiana contra *P. larvae*, el patógeno causal de la AFB.

Con este trabajo se evidencia el uso que han tenido los probióticos frente a agentes patógenos como *Paenibacillus Larvae* en abejas y se muestran los beneficios que traen para estas al mejorar, entre otras cosas, su sistema inmune, la digestión, su crecimiento y productividad.

Referencias bibliográficas

- Al-Ghamdi, A., Khan, K. A., Ansari, M. J., Almasaudi, S. B., & Al-Kahtani, S. (2018). Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. Saudi journal of biological sciences, 25(2), 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.005>
- Añón, G. (2018). Efecto de la administración de un probiótico sobre distintos patógenos que afectan la salud de las abejas melíferas. Tesina para optar por el título de Licenciado en Bioquímica. Universidad de la República de Uruguay
- Borracci, S. E., Chacana, P. A., Palacio, A. & Terzolo, H. R. (2004). Loque Americana de las abejas: Características y diagnóstico de la enfermedad. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 5, 1-5. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/alter/apic/loque.htm>
- Cabana, M. J., Tejerina, M. R., Benitez Ahrendts, M. R., & Fonseca, M. I. (2021). Efecto inhibitorio in vitro de bacterias lácticas aisladas de intestinos de *Scaptotrigona jujuyensis* sobre *Paenibacillus larvae*. CEDICE. ISBN 978-950-34-2018-8

- Campo Barrera, O. I., & Hincapié Llanos, G. A. (2023). Factores que determinan las propiedades fisicoquímicas de la miel de abejas: Revisión Sistemática de Literatura. *Revista Mutis*, 13(1), 1–28. <https://doi.org/10.21789/22561498.1851>
- Carvajal, V. (2020). Importancia de las abejas como polinizadores. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/21021/1/Importancia%20de%20las%20abejas%20como%20polinizadores2a.pdf>. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2023
- Castellanos Mena, A. A. (2019). Propuesta de modelo larval para bioensayos de abejas *Apis Mellifera* en condiciones de Cuba (Doctoral dissertation, Universidad de Sancti Spíritus José Martí Pérez)
- Cauich, R., Ruiz, J., Ortíz, E., & Segura, M. (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432-1442. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Faragalla, K. M., Burton, J. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME journal*, 14(2), 476–491. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Mallory, E., Chernyshova, A. M., Allen-Vercoe, E., Reid, G., & Thompson, G. J. (2022). Disentangling the microbial ecological factors impacting honey bee susceptibility to *Paenibacillus larvae* infection. *Trends in Microbiology*, 31(5), 521-534. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.11.012>
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., & Fries, I. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41 (1), 99-108 <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>
- García Carrasco, A. (2022). Importancia de las abejas para el planeta, ¿es posible un mundo sin abejas? Disponible en: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/141605/IMPORTANCIA%20DE%20LAS%20ABEJAS%20PARA%20EL%20PLANETA%20ES%20POSIBLE%20UN%20MUNDO%20>. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2023
- Kačániová, M., Terentjeva, M., Žiarovská, J., & Kowalczewski, P. Ł. (2020). *In Vitro* Antagonistic Effect of Gut Bacteriota Isolated from Indigenous Honey Bees and Essential Oils against *Paenibacillus Larvae*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6736. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186736>

Molina, A.. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 601-611. <https://dx.doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>

Rodríguez Díaz, J. A., Hernández García, J. E., Sebastián Frizzo, L., Fernández León, K. J., Sánchez, L., & Solenzal Valdivia, Y. (2021). Caracterización in vitro de propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp. aislados del tracto digestivo de abejas. *Revista de Salud Animal*, 43(2). Epub 09 de agosto de 2021. Recuperado en 28 de septiembre de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2021000200004&lng=es&tlng=es.

Romero Guzmán, A. S. (2020). A prophylactic probiotic to fight *Paenibacillus larvae* infection in honey bees (T). University of British Columbia. Retrieved from <https://open.library.ubc.ca/collections/ubctheses/24/items/1.0394247>

Rovey, M. F. P., Betancourt, D. C. P., de la Paz Moliné, M., & de las Mercedes Olivia, M. (2022). Efecto del extracto hexánico de *Achyrocline satureioides* sobre el crecimiento de *Paenibacillus larvae*, patógeno de *Apis mellifera*. *Ab Intus*, (10), 33-49. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7484788>

Truong, AT., Kang, J.E., Yoo, MS. et al. (2023). Probiotic candidates for controlling *Paenibacillus larvae*, a causative agent of American foulbrood disease in honey bee. *BMC Microbiol* 23, 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02902-0>

Vázquez, M. M., Moliné, M. D. L. P., Dominguez, E., Damiani, N., Fernández, N. J., Casalongue, C., & Gende, L. B. (2021). Estudio del efecto protector de quitosanos de alto peso molecular contra la enfermedad Loque americana en larvas de abejas (*Apis mellifera*). Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/155162>. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2023