



**DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA *LACTOBACILLUS* SPP. CON
POTENCIAL PROBIÓTICO EN *APIS MELLIFERA***

**Trabajo de Diploma en opción al título de
Ingeniero Agrónomo**

Autor: Melissa Del Rio Cantillo

Tutores: Lic. Marlene María Martínez Mora, Ms. C
Lic. Ana Julia Rondón Castillo, Dr. C.

Matanzas, 2023

Pensamiento

"La abeja es un símbolo de la sabiduría, pues recoge la miel de las flores sin dañarlas, y la transforma en algo más dulce y saludable".

San Ambrosio

Nota de aceptación

Presidente del Tribunal Firma

Miembro del Tribunal Firma

Miembro del Tribunal Firma

Dado en Matanzas, el día 13 del mes de diciembre del año 2023.

“Año del 65 de la Revolución”

Declaración de autoridad

Declaro que yo, **Melissa Del Rio Cantillo** soy el único autor de este Trabajo de Diploma por lo que autorizo a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo, con la finalidad que estime conveniente.

Firma

Dedicatoria

A mis padres Lissy Cantillo Averhoff y José Manuel Del Río Alfonso por confiar siempre en mí y apoyarme en cada paso de este camino, que me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia. Gracias por ser mi inspiración y mi orgullo.

A mis abuelos, que se preocuparon constantemente por mí y por mi futuro, que me animaron a seguir adelante y a cumplir mis sueños.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis tutoras: la Ms.C Marlene María Martínez Mora y la Dr.C Ana Julia Rondón Castillo, por su orientación, paciencia y apoyo durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Sus conocimientos y experiencia fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, especialmente a mis padres y abuelos.

A mis amigas Rosany y Laura por apoyarnos en todo y estar siempre juntas durante toda la carrera.

A mi pareja Kevin Brayan Pérez Benitez por su apoyo y darme ánimos en todo momento.

Opinión de los tutores

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo obtener un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* con potencial probiótico para la mejora de la salud de las abejas. En su formulación se empleó como sustitutos de la fuente de carbono y de nitrógeno del medio MRS la miel final de caña de azúcar y el hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente. La optimización de estos factores se realizó a través del método de superficie respuesta con un diseño experimental compuesto central rotativo 2³. Se utilizó el programa estadístico *Statgraphics Plus* versión 5.1 para diseñar la matriz que formuló las combinaciones que debían efectuarse. Como resultado final se obtuvo un nuevo medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31 que contiene miel final de caña de azúcar con 36 % de azúcares reductores totales y HELSc con 8,8% de Nitrógeno total. Los parámetros de crecimiento en ambos medios fueron similares y se obtuvo un conteo celular superior a 12 Log UFC. mL⁻¹ a las 24h. Se observó una disminución del pH en el medio MCL31 de 6,5 a 4,3 y en el medio MRS hasta 4,23. Se concluye que el nuevo medio satisface las necesidades nutricionales de esta bacteria probiótica.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain a culture medium for the growth of *Lactobacillus* with probiotic potential to improve the health of bees. In its formulation, the final sugar cane honey and the enzymatic hydrolyzate of *Saccharomyces cerevisiae* yeast were used as substitutes for the carbon and nitrogen source of the MRS medium, respectively. The optimization of these factors was carried out through the response surface method with a rotating central composite experimental design 23. The statistical program Statgraphics Plus version 5.1 was used to design the matrix that formulated the combinations that should be carried out. As a final result, a new culture medium was obtained for the growth of strain L31 that contains final sugar cane honey with 36% of total reducing sugars and HELSc with 8.8% of total Nitrogen. The growth parameters in both media were similar and a cell count greater than 12 Log CFU was obtained. mL⁻¹ at 24h. A decrease in pH will be observed in the MCL31 medium from 6,5 to 4,3 and in the MRS medium up to 4,23. It is concluded that the new medium satisfies the nutritional needs of this probiotic bacteria.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1-Importancia de las abejas	3
1.2- Principales enfermedades presentes en las abejas.....	3
1.3- Control de las enfermedades apícolas.	6
1.3.1- Control de la Loque americana:	6
1.3.2- Control de la nosemosis:	7
1.3.3- Control de la varroasis:	7
1.4- Alternativas al uso de los antibióticos en el control de las enfermedades apícolas.	8
1.6- Características generales del género <i>Lactobacillus</i>	13
1.7- Medios de cultivos tradicionales para el crecimiento de <i>Lactobacillus</i>	14
1.9- Curva de crecimiento típica del género <i>Lactobacillus</i>	16
1.10- Composición química del hidrolizado de levadura. Caracterización del producto.	16
1.11- Empleo de la miel final en la formulación de medios de cultivos microbiológicos	18
1.12- Empleo del hidrolizado de levadura en la formulación de medios	18
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1- Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31.....	21
2.1.1- Inóculo microbiano	21
2.1.2- Composición del medio y condiciones de fermentación.....	21
2.1.3- Diseño experimental.....	22
2.2- Estudio de la dinámica de crecimiento y disminución del pH de la cepa L31 en el nuevo medio de cultivo.	24
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	25
3.1 – Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31.....	25
3.2- Estudio de la cinética de crecimiento de la cepa L31 en el medio tradicional y en el MCL31.....	29
3.3- Evaluación económica del costo de producción del biopreparado probiótico a escala de laboratorio	33
CONCLUSIONES.....	35
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Introducción

INTRODUCCIÓN

Las abejas son insectos sociales que desempeñan un papel fundamental en la polinización de las plantas, la producción de miel y la obtención de otros productos apícolas. Sin embargo, desde hace algunos años, se observa una disminución en la población de estos insectos a nivel mundial lo cual está asociado a diversos factores que incluyen: el cambio climático, la pérdida de hábitat, el uso de pesticidas, la competencia con especies invasoras y la presencia de enfermedades y parásitos (Arredondo, 2018).

Entre las enfermedades más frecuentes que afectan a las abejas, se encuentran: la nosemosis, la varroosis y la loque americana. La nosemosis es una infección causada por el microsporidio *Vairimorpha ceranae*, que afecta al intestino medio de las abejas y provoca diarrea, debilidad y disminución de la esperanza de vida (Vargas *et al.*, 2021). La varroosis es una parasitosis causada por el ácaro *Varroa destructor*, el cual se alimenta de la hemolinfa y transmite virus que causan deformidades, inmunosupresión y mortalidad. La loque americana es una enfermedad bacteriana causada por *Paenibacillus larvae*, que afecta a las larvas y provoca la formación de escamas en las celdas de la colmena impidiendo el desarrollo normal de las mismas (Antúnez *et al.*, 2013).

Ante este panorama, se hace necesario buscar alternativas para proteger la salud de estos insectos y mejorar su productividad. Una de estas vías es el uso de probióticos, que son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios al hospedero. Otras propiedades que le son atribuidas a estos biopreparados son: la mejora de la digestión, del sistema inmunitario y su resistencia a las enfermedades. (Kuzyšinová *et al.*, 2016).

Una de las problemáticas actuales en la tecnología de obtención de probióticos es precisamente el establecimiento de medios de cultivo que contribuyan al crecimiento de microorganismos en concentraciones celulares suficientes que les permitan llegar al TGI y establecerse en este ecosistema, porque la utilización de los medios tradicionales implica un mayor costo económico (Lee, 2005).

La producción de biomasa a partir de *Lactobacillus* spp. requiere de un medio de cultivo basal que satisfaga los requerimientos nutricionales de estas bacterias. Por esta razón, se busca utilizar materias primas baratas, que sean abundantes,

renovables y de bajo impacto ambiental, para reducir los costos y los residuos de la producción de medios de cultivo (García *et al.*, 2005). Algunos ejemplos de estas materias primas son los residuos agroindustriales, como la miel final de la caña de azúcar y las cremas de destilería, que son ricos en compuestos orgánicos e inorgánicos y pueden ser aprovechados por los microorganismos.

Problema Profesional:

La selección de medios de cultivos adecuados y económicos constituye un factor limitante para las producciones a escala industrial de un probiótico.

Hipótesis:

La formulación de un nuevo medio de cultivo con materias primas baratas y de alta disponibilidad, permitirá el crecimiento de una cepa del género *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico en *Apis mellifera*.

OBJETIVOS

General

Obtener un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico para la mejora de la salud de las abejas.

Específicos

1. Optimizar un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de la cepa con potencial probiótico L31.
2. Determinar la cinética de crecimiento de la cepa L31 con potencial probiótico, en el medio de cultivo optimizado y el medio tradicional.
3. Estimar el costo de producción del biopreparado con potencial probiótico a escala de laboratorio.

Revisión Bibliográfica

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1- Importancia de las abejas

La abeja *Apis mellifera* es una especie de insecto social que ha colonizado con éxito numerosos ecosistemas en todo el mundo y desempeña un papel crucial en la polinización de plantas silvestres y cultivadas, con implicaciones sustanciales para la economía global y los ecosistemas naturales (Feketéné *et al.*, 2023). Se estima que 70 de los 107 cultivos más importantes que intervienen en la dieta humana dependen de los polinizadores para su reproducción, de los cuales estos insectos representan entre el 40-50% (Arredondo *et al.*, 2018).

Constituyen un eslabón clave en la producción de alimentos debido a su gran potencial agronómico y económico. Se obtienen de ellas valiosos productos comerciales como cera, polen, propóleo, jalea real y lo más importante, la miel (Dafar, 2018; Hussain, *et al.*, 2022).

En Cuba, estos derivados forman parte de uno de los rubros exportables más importantes del Grupo Empresarial Agroforestal del Ministerio de la Agricultura (MINAG), al aportar anualmente ingresos de unos 20 millones de dólares (Opciones, 2018). Además de las tradicionales ventas de miel y cera al exterior, también se obtienen suplementos nutricionales como los complementos PANMIEL (Suárez *et al.*, 2017) y PROPIOMIEL (Vargas *et al.*, 2017), se elaboran cremas en la industria cosmética, bebidas, velas, bombones y producciones para la industria farmacéutica. Desde hace algunos años, la miel también se destina como insumo para la producción de medios biológicos utilizados contra plagas, elaborados en Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (Salomón, 2018).

1.2- Principales enfermedades presentes en las abejas

Debido al estilo de vida colonial que desarrollan las abejas, estas son susceptibles a la acción de diferentes agentes patógenos que incluyen: bacterias, hongos, ácaros y virus. Las enfermedades que se producen son muy peligrosas y pueden llevar a la muerte de la colonia, por lo que ocasionan importantes mermas productivas (Goulson *et al.*, 2015; Audisio, 2017; Verde y Bande, 2017).

Entre de los patógenos que más afectan a las abejas están la bacteria *Paenibacillus larvae*, el microsporidio *Vairimorpha ceranae*, el ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN (Pérez, 2017).

Paenibacillus larvae

Es el agente causal de la Loque Americana (L.A), una de las enfermedades más severas que afecta a la cría de las abejas a nivel global. *P. larvae* es un bacilo Gram positivo, catalasa negativa, anaerobio facultativo, formador de endosporas y con bajo porcentaje de guanina y citosina en su ADN (Genersch *et al.*, 2006; Genersch, 2010; Arredondo *et al.*, 2017).

Las larvas de las abejas obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas de este patógeno que son suministradas por las nodrizas (Hornitzky, 1988). Estos insectos adultos no son susceptibles a este bacilo pero constituyen vectores de las esporas y pueden transportar altas cargas en su tracto digestivo como individuos asintomáticos (Stephan *et al.*, 2020). Estas estructuras de resistencia una vez que llegan al lumen del intestino larval germinan, dando lugar a células vegetativas. Luego proliferan y se mueven hacia el epitelio y destruyen las interacciones célula-célula e invaden el espacio intercelular, hasta llegar a la hemolinfa del hospedero de manera muy veloz (Yue *et al.*, 2008). Posteriormente, la larva muere, lo que es acompañado por la esporulación de las células vegetativas. Las esporas se diseminan dentro de la colmena cuando las abejas encargadas de la limpieza contaminan su aparato bucal al remover las larvas muertas y después, las transmiten a las larvas cuando se alimentan (Arredondo *et al.*, 2017).

Vairimorpha ceranae

La nosemosis, es una parasitosis que afecta el tracto digestivo de las abejas *A. mellifera* y es causada por tres especies distintas de microsporidios: *Vairimorpha apis*, *V. ceranae* y *V. neumannii* (antiguamente clasificados dentro del género *Nosema* y actualmente incluidas dentro del género *Vairimorpha*) (Martín *et al.*, 2018; Imani *et al.*, 2022). Vale la pena destacar que la especie *V. ceranae* descrita originalmente para la especie de abeja *Apis cerana* (Fries *et al.*, 2006) fue encontrada en poblaciones de *A. mellifera* a partir de inicio de este milenio y a partir de allí, los reportes de infección por *V. ceranae* se extendieron mundialmente, aunque se desconoce a ciencia cierta desde cuando ocurre esta interacción con *A. mellifera* (Martín *et al.*, 2018).

Estas tres especies de microsporidios se reproducen rápidamente dentro de las células epiteliales del intestino medio (ventrículo) de las abejas adultas (reina, obreras y zánganos) y ocasionan la destrucción de las células epiteliales encargadas de la digestión y asimilación del alimento lo que provoca un estrés nutricional en las abejas infectadas. Otros daños observados a nivel individual demuestran una reducción en el período de vida y un efecto negativo en la orientación y habilidades como forrajeadoras en las obreras infectadas. A nivel de colonia, los daños causados por la nosemosis pueden ser graves cuando la prevalencia y niveles de infección son altos, lo que conduce a una reducción en las áreas de cría y en la población de individuos adultos y en consecuencia, una reducción en la producción de miel de las colonias hasta llegar al colapso y pérdida de las mismas (Arredondo, *et al.*, 2018; Vargas *et al.*, 2021).

Los síntomas que se notan en la colmena afectada son: inquietud en las abejas, disminución de la actividad y debilitamiento. También se ven muchas arrastrándose en el fondo y sobre los marcos. Cuando se remueve el techo, fuera de la colmena se observa que las abejas infectadas apenas logran volar unos pocos metros sin posarse. El abdomen a menudo está extendido por las materias fecales y se verá brillante y grasiento (Li *et al.*, 2018).

Ptaszyńska *et al.*, (2016) comprobaron que a medida que aumenta la contaminación de las abejas con este hongo, también se incrementan las levaduras oportunistas, lo que hace que la despoblación de la colmena sea aún más rápida.

Varroa destructor y virus ARN

La varroasis es una enfermedad parasitaria de gran significación para el sector apícola en Cuba (Sanabria *et al.*, 2016). Se dice que la práctica actual de la apicultura cubana se transformó a partir del diagnóstico en el país de la presencia del ácaro *Varroa destructor* en 1996. Este parásito indujo cambios significativos en el manejo de las colmenas, lo que en combinación con los problemas económicos que tuvo que enfrentar el país y en consecuencia la apicultura, incidieron de forma negativa en el parque de colmenas y provocó la pérdida de unas 60 000 familias de las que se recuperaron unas 40 000 (Pérez, 2017).

V. destructor es un ácaro parásito que causa daños en la abeja, debilitándola, al deprimir su sistema inmune y favorecer la infección por otros patógenos, es letal si no se trata adecuadamente (Kefuss *et al.*, 2015; Traynor *et al.*, 2020). Se

presenta en todo el país, lo que lleva a la necesidad de aplicar productos acaricidas de forma sistemática para evitar la pérdida de las colmenas.

De acuerdo a lo expresado en el punto anterior, la presencia de *V. destructor* en las colmenas no solo es un problema en sí mismo, sino que aumenta su virulencia debido a su asociación con diferentes virus ARN. Los virus de la parálisis aguda, la parálisis crónica, la celda real negra, la cría ensacada y el virus de las alas deformadas se transmiten a través de estos agentes contaminantes (Anido, 2013; Antúñez *et al.*, 2013).

Este ácaro se alimenta exclusivamente de la hemolinfa (sangre) de las abejas. Se reproduce dentro de la cría de las obreras y los zánganos, con preferencia por estos últimos. *V. destructor* penetra dentro de una celda poco antes de la percolación y pone huevos (primer huevo macho, seguido y consecutivamente hembra) que se desarrollan en el interior de la celda operculada. El macho puede fecundar las hembras que lleguen a la madurez, normalmente una o dos dentro de una celda de obreras y tres o cuatro dentro de una celda de zánganos (Mendoza *et al.*, 2008; Genersch, 2010; Ramsey *et al.*, 2019).

Los síntomas observados son: colmenas débiles, abejas mal formadas, desorganización social, consumo anormal de las reservas de miel, pequeño grupo de abejas débiles y crías salteadas (Marche *et al.*, 2019).

1.3- Control de las enfermedades apícolas.

1.3.1- Control de la Loque americana:

Las esporas de *P. larvae* son extremadamente resistentes y poseen una viabilidad de hasta más de 20 años tanto en el campo, en la miel como en el material apícola, lo que favorece la diseminación de la infección. La resistencia de las esporas está relacionada con su estructura la cual les permite resistir al efecto de agentes desinfectantes (Arrivillaga, 2021). Por las características propias de la enfermedad, una vez que se detecta en una región es muy difícil que pueda erradicarse por completo de dicha zona. Las únicas medidas eficaces de control son: destrucción de la colmena total o parcial por fuego; desinfección de los materiales apícolas por medio de la irradiación con cobalto-60, lavado con soda cáustica e inmersión en parafina (Del Hoyo *et al.*, 1998). También se han combinado estas medidas con la aplicación de antibióticos, como la oxitetraciclina o el tartrato de tirosina. Sin embargo, el uso de antibióticos como

tetraciclinas para tratar la Loque americana puede tener como resultado una miel contaminada con residuos de antibióticos (Martel *et al.*, 2006). El cloranfenicol ha sido detectado en mieles y en otros productos del apiario en numerosos países (Bogusz *et al.*, 2004). Consecuentemente, los residuos de antibióticos en productos melíferos pueden causar reacciones alérgicas letales o serios efectos colaterales a consumidores hipersensibles.

1.3.2- Control de la nosemosis:

El antibiótico fumagilina es eficiente frente a *V. ceranae* (Williams *et al.*, 2008). Higes *et al.* (2011) encontraron que la estabilidad de la fumagilina es afectada por muchos factores y que su eficiencia depende del vehículo utilizado en las aplicaciones, concentración y el número de dosis que reciben las colonias. El uso de la fumagilina no es legal en los países europeos (Fries, 2010).

1.3.3- Control de la varroosis:

El parásito *V. destructor* es el principal obstáculo para la supervivencia de las colonias de abejas melíferas. El control de plagas implica principalmente el uso de drogas sintéticas que utilizadas con el criterio adecuado y de forma rotativa, son capaces de garantizar que los niveles de infestación se mantengan por debajo del umbral de daño. Aunque estos medicamentos son fáciles de usar y rápidos de aplicar, tienen numerosas desventajas. Su uso prolongado ha provocado la aparición de resistencia farmacológica en las poblaciones de parásitos tratados; además, los ingredientes activos y/o sus metabolitos se acumulan en los productos apícolas con posibilidad de riesgo para el consumidor final. Además, debe considerarse la posibilidad de que se produzcan fenómenos de toxicidad subaguda y crónica para las abejas adultas y sus formas larvianas (Bava *et al.*, 2022). Las abejas atacadas por ácaros pueden someterse a tratamientos mediante fumigación con pesticida si está disponible (Mendoza *et al.*, 2008). Para el tratamiento y control se recomienda la aplicación de acaricidas orgánicos como el timol, eucalipto, mentol y ácido fórmico. Se deben sacar las crías de zánganos de los panales (temprano en la primavera) (Mendoza *et al.*, 2008).

El uso de antibióticos como estrategia para el tratamiento o prevención de estas u otras enfermedades de las abejas puede provocar la aparición de organismos

resistentes, el desbalance en la homeostasis entérica y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo (Arredondo, 2018).

En Cuba, cuando se producen grandes infestaciones por *V. destructor*, *V. ceranae* y *P. larvae*, no se aplican medicamentos, antibióticos ni sustancias químicas para el tratamiento de las patologías de las colmenas, solo se practica el manejo integrado, que consiste en el saneamiento de las colmenas, la castra en el apiario para evitar el transporte de miel o panales infectados, el cambio de abejas reinas y de ser necesario, se realiza el sacrificio de las colmenas si se encuentran brotes de enfermedades infecciosas graves, lo que trae consigo la disminución de las poblaciones de estos insectos (Pérez, 2017).

1.4- Alternativas al uso de los antibióticos en el control de las enfermedades apícolas.

Ante la prohibición del uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades apícolas, el uso de aditivos zootécnicos constituye una alternativa, debido a su capacidad de modular el sistema inmunológico y la microflora intestinal en las abejas; además de tener una función antagonista contra patógenos (Milián *et al.*, 2023). Ello se basa principalmente en la utilización de sustancias de origen natural que no afectan de manera adversa a los productos apícolas, ni suponen una carga para el medio ambiente. Entre estas sustancias se encuentran los ácidos grasos, aceites esenciales y los probióticos. Estos últimos son microorganismos que al ser suministrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al huésped (Kuzyšinová *et al.*, 2016).

Varroasis:

Los productos naturales poseen un alto potencial para el control de diversas plagas, por su eficacia diversa, principalmente ovicidas y anti-alimentarias, no generan efectos adversos en otras especies. Además, se ha reportado que son una elección de tratamiento altamente efectivo contra plagas resistentes a insecticidas sintéticos (Reyna *et al.*, 2021).

En las últimas décadas se han desarrollado estrategias alternativas contra *V. destructor* mediante el uso de productos derivados de plantas como: los extractos de hojas, aceites esenciales (AE) y ácidos orgánicos (AO), los cuales poseen actividad acaricida y no representan riesgo alguno tanto para la salud de las abejas como para los humanos. Los estudios de eficacia realizados con AE

demuestran que a pesar de la multitud de pruebas de laboratorio y de campo, pocos de ellos han salido al mercado. Los resultados obtenidos con AE son diferentes incluso con la misma especie de planta. La razón de esta discrepancia radica en las diversas técnicas de estudio empleadas así como en la variabilidad de las composiciones químicas de las plantas (Bava *et al.*, 2022).

Al investigar la actividad inhibidora de los AE contra patógenos, no se debe olvidar considerar su posible efecto tóxico sobre las abejas melíferas. Este aspecto fue abordado por Albo *et al.* (2003) quienes determinaron los valores de dosis letal media de los extractos de tomillo, hierba de limón, orégano y albahaca para abejas melíferas adultas. Los resultados de estos experimentos confirmaron que el AE se puede utilizar en las abejas melíferas porque su toxicidad para ellas era nula o mínima (Kuzysinova *et al.*, 2016).

Con respecto al empleo de ácidos orgánicos, Rosenkranz *et al.* (2010) describieron al ácido oxálico y ácido fórmico como los acaricidas blandos más utilizados en la apicultura, compuestos con bajo riesgo para la salud de las abejas, así como la presencia poco frecuente o nula de residuos en productos de la colmena (Calderón *et al.*, 2014).

El ácido fórmico es incoloro y volátil, se encuentra presente en picaduras y/o venenos bucales de una amplia gama de himenópteros, además de ser una sustancia natural presente en la miel. Las aplicaciones de este ácido han sido utilizadas desde los años ochenta en países europeos, donde Alemania es pionera en dicha aplicación. El uso de este biopesticida como método de control de la varroasis presentó una eficiencia del 60-92 %, variando en función del método de aplicación, debido a que diversos factores como: condiciones climáticas y temperatura (10 a 25 °C), temporada de aplicación, distancia desde el sitio de volatilización del ácido fórmico hasta el bastidor, cría presente y condiciones de la colmena, pueden interactuar en la eficacia del producto (Reyna *et al.*, 2021). Este ácido a pesar de ser un derivado natural posee desventajas y se describieron daños en la cría operculada y no operculada, asociándose a una incorrecta metodología de aplicación. En la actualidad, se describieron resultados favorables mediante el uso de ácido fórmico al 70 %, utilizando 10 mL por colmena durante un período experimental de 24 días (Sajid *et al.*, 2020).

El ácido oxálico es una sustancia cristalizada que naturalmente se encuentra en abundancia en la composición de muchas plantas y constituye un tratamiento de primera elección para el control de la varroasis en toda Europa (Nanetti *et al.*, 2003). Dicho compuesto orgánico, reporta una efectividad de más del 95 % en la fase forética del ácaro y no presenta efecto contra ácaros en cría operculada (Planinc, 2004). En comparación al ácido fórmico, el ácido oxálico no se ve afectado por la temperatura ambiental al momento de su aplicación, pero se han reportado casos de pérdidas de colmenas o disminución en los niveles de la cría por sobredosificación. Se han descrito diversas metodologías respecto a la aplicación de ácido oxálico, entre estas las más utilizadas, la aspersion, en combinación con jarabe de azúcar sobre las abejas o mediante cristales de evaporación con calor (Rademacher, 2006; Reyna *et al.*, 2021).

Loque americana:

Kuzysinova *et al.* (2014) señaló una fuerte inhibición de *P. larvae* cuando se utilizaron los AE procedentes del orégano, tomillo y clavo, sin embargo, los pertenecientes a la manzanilla, romero e hinojo mostraron una actividad antibacteriana débil o nula.

Los ácidos undecanoico, palmitoleico, linoleico y ricinoleico parecieron más eficaces cuando se investigó la actividad inhibidora de 38 ácidos grasos contra *P. larvae* y obtuvieron resultados positivos con 24 ácidos probados (Feldlaufer *et al.*, 1993).

Hornitzky (2003) probó la actividad inhibidora de 28 ácidos grasos contra *P. larvae*. En 15 de ellos se observó una acción antibacteriana significativa. La mayor actividad se demostró para los ácidos undecanoico, láurico, caproico, homo- γ -linolénico, γ -linolénico, ricinoleico, linoleico, linolénico, araquidónico y mirístico.

Rada *et al.* (2009) presentaron una revisión de ácidos grasos activos contra este agente. Los ácidos que produjeron las zonas de inhibición más grandes fueron el láurico, miristoleico, palmitoleico, linoleico, undecanoico y ricinoleico, con diámetros de inhibición que oscilaron entre 60 y 80 mm. Entre los ácidos con

halos entre 40 y 50 mm se incluyen por ejemplo: los ácidos caproico, tridecanoico, linolénico, γ -linolénico, homo- γ -linolénico y araquidónico.

Varios autores informaron sobre la capacidad de las bacterias probióticas para inhibir el crecimiento de *P. larvae*. Evans y López (2004) investigaron una mezcla de bacterias no patógenas compuesta por *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei* y *L. plantarum*. Estas cepas registraron una mayor producción de péptidos antimicrobianos (abaecina, apidaecina, himenoptaecina y defensina), lo que resultó en una mejor inmunidad de las abejas melíferas contra la acción de microorganismos patógenos.

Cepas de *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. y *Enterococcus faecium* suministradas a las abejas en solución azucarada influyeron positivamente en las tasas de mortalidad de las abejas durante el invierno (Rada *et al.*, 2009).

Truong *et al.* (2023) estudiaron un total de 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 para el desarrollo de biopreparados para la prevención de la Loque americana.

Nosemosis:

Bravo (2014) expresó que la única medida que actualmente se puede llevar a cabo para mantener sanas y pobladas las colmenas es la prevención, que consiste en realizar recambio de reinas constantemente para evitar que se generen las condiciones propicias para el desarrollo de hongos. Si la prevención no es suficiente, es necesario contar con un tratamiento alternativo que sea seguro para las abejas y que no deje residuos en los productos de la colmena. Existen especies vegetales autóctonas del bosque nativo esclerófilo como boldo, peumo, maitén y litre que poseen AE, con propiedades antifúngicas contra *V. apis* y *V. ceranae*, los cuales son inocuos para la abeja *Apis mellifera*.

Otros autores emplearon AE en la inhibición de este patógeno. Rada *et al.* (2009) presentaron una revisión de los extractos probados para determinar su actividad contra *P. larvae*, incluidas también las respectivas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Entre los extractos más eficaces se encontraron los de lila india

(*Melia azadirachta*) con una CIM de 10 a 800 µg/ml, canela de Ceilán con una CIM de 25 a 100 µg/ml y hierba de limón con una CIM de 50 a 100 µg/ml. Para varios extractos, la CIM alcanzó 300 µg/ml. Entre ellos se encontraban la alcaravea (*Carum carvi*), Eugenia spp., el anís (*Pimpinella anisum*) y la *Verbena* spp. Se llevaron a cabo experimentos para probar la actividad del AE en fase gaseosa *in vitro* (Kloucek *et al.*, 2008). El efecto más pronunciado se observó con el AE de rábano picante (*A. rusticana*), seguido de los aceites de tomillo, menta y ajedrea (*Satureja hortensis*).

Vásquez *et al.* (2012) informaron que los lactobacilos y bifidobacterias aislados del estómago de las abejas melíferas eran capaces de inhibir el crecimiento de este patógeno. Estos autores también observaron que las cepas individuales de bacterias probióticas diferían en su actividad inhibidora. Mudroňova *et al.* (2011) aislaron lactobacilos del tracto intestinal de abejas melíferas sanas y observaron que inhibían significativamente el crecimiento de *P. larvae* y también mostraban otras propiedades probióticas positivas.

1.5- Principales microorganismos empleados como probióticos.

Ante la presencia de las enfermedades en las abejas, una posible solución natural al problema consistiría en completar la maduración de la microbiota intestinal de la larva o fortalecerla con la administración de microorganismos beneficiosos como las bacterias ácido lácticas (Audisio, 2017).

El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada, miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium* se utilizan tanto en humanos, como en animales (Reid, 1999; Cross, 2002; Ducatelle *et al.*, 2015).

Principales criterios de selección de las cepas candidatas a probióticas para abejas (Antúnez, 2012):

- Deben ser resistentes a las altas concentraciones de azúcares.
- Tener una alta capacidad de crecimiento en el medio.
- Producir sustancias antimicrobianas frente a los patógenos de las abejas.
- Crecer a diferentes pH.
- Estimular el sistema inmunológico de las abejas.

- Incrementar la digestibilidad de los nutrientes o accionar como suplemento nutricional.
- Mejorar la salud y la producción de miel.
- Ser inocuo para las larvas o abejas adultas y no provocar toxicidad.

1.6- Características generales del género *Lactobacillus*.

Taxonómicamente, el género *Lactobacillus* se ubica en la Familia *Lactobacillaceae* (Kandler y Weiss 1986; Garrity *et al.*, 2004) y sus integrantes presentan las características siguientes:

- células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos, agrupados en cadenas.
- No son mótils en general, pero cuando la presentan es por la aparición de flagelación peritrica.
- Son Gram-positivos y sólo las células viejas o muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram.
- No esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato.
- Su metabolismo es fermentativo. Producen lactato como producto final; además pueden formar acetato, formiato, succinato, CO₂ y etanol.
- Generalmente no reducen los nitratos, no licuan la gelatina, no producen indol ni H₂S.
- No producen catalasa, sin embargo, algunas cepas descomponen el peróxido a través de la producción de una pseudocatalasa.
- Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad lipolítica por la acción de lipasas intracelulares.
- Tienen requerimientos nutricionales complejos. Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Requieren no sólo carbohidratos

como fuentes de carbono y energía, sino también, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos.

- Viven en un rango de temperatura entre 2 – 53 °C, con una temperatura óptima entre 30 – 40 °C.
- Crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial entre 4,5 - 6,4 y con pH óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2.
- Son generalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5 % hasta el 10 %) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.
- Las principales vías de la fermentación para las hexosas son: la de Embden-Meyerhof, donde se convierte 1 mol de hexosa en 2 moles de ácido láctico por fermentación homoláctica y la vía del 6-fosfogluconato, cuyo resultado es 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol (o de ácido acético) y 1 mol de ácido láctico, por fermentación heteroláctica.

1.7- Medios de cultivos tradicionales para el crecimiento de *Lactobacillus* spp.

Para la formulación de un medio de cultivo comercial es necesario que este cumpla con todos los requerimientos nutricionales (nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales) para el buen crecimiento del microorganismo; se requiere que estén biodisponibles en una materia prima obtenida como subproducto de algún otro proceso, o sea, abundante en el mercado y de bajo costo de producción (MBarga *et al.*, 2019).

Los medios de cultivo más utilizados para el desarrollo de *Lactobacillus* spp. son: Agar Rogosa-Mitchell-Wiseman y Agar de Man-Rogosa y Sharpe.

Agar Rogosa-Mitchell-Wiseman: es un medio de cultivo estándar utilizado para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. a partir de la biota humana y alimentos. En su composición, incluye azúcares en proporciones relevantes (glucosa, sacarosa o arabinosa), extracto de levadura y peptona. Se considera un medio selectivo para evitar el crecimiento excesivo de mohos, estreptococos y otros microorganismos. El citrato de amonio, acetato de sodio, ácido acético y el sulfato ferroso actúan como inhibidores de los estreptococos y otros organismos

contaminantes. Por otra parte la peptona de caseína, extracto de levadura y sal de amonio, proporcionan la fuente de nitrógeno, Tween 80 suministra los ácidos grasos necesarios para el crecimiento, el manganeso y magnesio actúan como factores de crecimiento y la glucosa es fuente universal de energía y carbono. El fosfato, junto con acetato y ácido acético, estabilizan el pH en 5,4-5,5 (Sin *et al.*, 2017).

Agar de Man-Rogosa y Sharpe: La formulación MRS fue desarrollada por De Man, Rogosa y Sharpe para permitir el crecimiento de lactobacilos. Sin embargo, como el medio posee un bajo grado de selectividad, especies de *Pediococcus* y *Leuconostoc*, así como, algunas bacterias secundarias pueden crecer en el mismo.

La presencia de acetato de sodio, el ambiente anaeróbico y el bajo pH en el medio de cultivo, contribuyen en la elevada supresión de la flora bacteriana acompañante. El crecimiento óptimo de lactobacilos es logrado por el adecuado balance de las sales de hierro, magnesio, manganeso y la presencia de Tween 80, así como, una rica mezcla de bases nutritivas (Rodríguez y Zhurbenko, 2018).

1.8- Perfil de fermentación de carbohidratos del género *Lactobacillus*.

En el proceso de fermentación, los microorganismos emplean carbohidratos y compuestos relacionados como fuente de energía que son oxidados parcialmente generándose ácidos orgánicos, la oxidación es incompleta porque el aceptor final de electrones no es externo, sino que, se trata de un compuesto orgánico resultante de la ruptura de los carbohidratos, con lo cual los microorganismos solo aprovechan una parte de la energía disponible en el sustrato (Resa *et al.*, 2007).

Durante la fermentación los ácidos orgánicos resultantes se acumulan y se produce un gradual descenso del pH, el bajo pH (menor a 4,5-5,0) combinado con la alta concentración de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y de la mayoría de los microorganismos que alteran el producto, de esta forma además de lograr que el producto sea seguro desde el punto de vista microbiológico se extiende su tiempo de vida útil (Saithong *et al.*, 2010).

Las bacterias ácido lácticas se pueden clasificar de acuerdo a los productos resultantes de su fermentación. Se denominan homolácticas a las BAL que sólo

producen ácido láctico como producto único o principal de la fermentación y heterolácticas a aquellas que generan ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético en cantidades equimolares (König *et al.*, 2009).

Las especies de los distintos géneros de BAL difieren en su capacidad fermentadora y dentro de una misma especie existen variaciones a nivel de cepa que se deben a la capacidad específica de éstas para asimilar los nutrientes del medio (Olivera, 2011).

1.9- Curva de crecimiento típica del género *Lactobacillus*.

Muchos autores han descrito el crecimiento de una población bacteriana como un proceso exponencial o geométrico, pues cada ciclo de división (también conocido como generación) hace que de una célula inicial surjan dos, luego de estas dos 4 y así sucesivamente. El tiempo necesario para que se forme cada una de estas generaciones se conoce como el tiempo de generación o tiempo de duplicación, que puede ser fácilmente calculado, generalmente es constante y casi siempre especie-específico (Parada, 2020).

La velocidad de crecimiento es un factor importante en el predominio de los microorganismos en un ecosistema y esta característica es esencial en la selección de un microorganismo probiótico (Gilliland, 1981). Algunos autores definen que cuando se evalúan las potencialidades de las cepas candidatas a probióticas se debe comprobar que éstas presenten una alta velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación igual o cercano a una hora. De esta manera, los microorganismos que se utilicen, tendrán mayores posibilidades de duplicarse rápidamente en el TGI y lograrán su predominio en este ecosistema (Gorbach, 1991; Garriga *et al.*, 1998; Vera *et al.*, 2021).

1.10- Composición química del hidrolizado de levadura. Caracterización del producto.

La pared celular de las levaduras está compuesta fundamentalmente por polisacáridos y glicoproteínas en forma de una red tridimensional, que funciona como una estructura altamente dinámica y adaptable al medio que la rodea (Rodríguez, 2017). Se estima que el porcentaje de polisacáridos que contiene la pared celular de las levaduras oscila entre 85-90% y sólo de 10-15% de proteínas. Estos carbohidratos y proteínas se encuentran en forma de glicoproteína y forman cadenas y estructuras ramificadas de moléculas de glucosa, manosa y N-acetilglucosamina (Orlean, 2012). Cuando la célula de

levadura es sometida al proceso de hidrólisis, se liberan los oligosacáridos de mananos y glucanos. Los métodos para realizar la hidrólisis se agrupan en químicos (hidrólisis ácida y básica), físicos (hidrólisis térmica) y biológicos (autólisis con o sin control e hidrólisis enzimática) (Badia *et al.*, 2012).

Pizarro *et al.* (2014) refieren que cuando se van a emplear aditivos nutricionales, obtenidos a partir de la hidrólisis de los polisacáridos de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*, es preferible utilizar los elaborados con el método enzimático, ya que este proceso acontece en condiciones biológicas suaves de pH, temperatura y presión. Por su parte, las hidrólisis químicas y físicas destruyen en alguna medida sustancias de interés biológico.

Pérez (2000) desarrolló la hidrólisis de la *S. cerevisiae* mediante el método enzimático, con el objetivo de obtener un aditivo para la alimentación animal. Este proceso se logró a partir de la aplicación de enzimas hidrolíticas, producidas por un cultivo de *Bacillus subtilis* cepa E-44 a estas levaduras. Este procedimiento posibilitó la presencia, entre otros compuestos, de oligosacáridos de glucanos y mananos y células viables de *B. subtilis* y sus endosporas; composición que permite considerar al biopreparado con alto potencial de actividad simbiótica.

Este mismo autor en el año 2016 comparó los contenidos de oligosacáridos totales y de glucanos y mananos de *S. cerevisiae* de destilería de alcohol, producidos por diferentes métodos de hidrólisis (enzimática con un crudo de *Bacillus subtilis* E-44, básica, ácida, autolítica y tratamiento térmico). Estos autores demostraron que la vía enzimática provocó la obtención de mayores niveles de estas sustancias prebióticas, lo que permitió reforzar las propiedades del producto, y una vez aplicado a los animales, fortaleció el sistema inmune y propició un adecuado balance microbiano en el intestino.

Sánchez, (1997) diseñó un método para obtener β -1,3-glucano, a partir de la hidrólisis básica de las paredes celulares de *S. cerevisiae*. El proceso se optimizó para la producción de concentraciones adecuadas de dicho compuesto y se procedió a su purificación para usarlo como producto con acción farmacológica adyuvante e inmunoestimulante.

1.11- Empleo de la miel final en la formulación de medios de cultivos microbiológicos

Las melazas, mieles finales o melazas “blackstrap”, suelen ser definidas, por muchos autores como los residuos de la cristalización final del azúcar de los cuales no se puede obtener más azúcar por métodos físicos.

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en la preparación del azúcar mediante una cristalización repetida. El proceso de evaporación y cristalización es usualmente repetido tres veces hasta el punto en el cual el azúcar invertido y la alta viscosidad de las melazas ya no permitan una cristalización adicional de la sacarosa (Swan y Karalazos 1990).

Un subproducto de gran utilidad en la alimentación animal como fuente de energía y aglutinante en la elaboración de bloques multinutricionales, son las mieles, más comúnmente conocidas como melaza, la cual es un líquido denso y viscoso de color oscuro producto de la refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar (Berman, 2011). Es importante aclarar que existen diferentes melazas, desde la que contiene todo el azúcar (rica), hasta la que resulta de completar el proceso de extracción en el ingenio (final). Esto permite que exista una gran diferencia en la composición química de estas, con un contenido de nitrógeno del 0,44 % para la final y 0,26 % para la rica. Sin embargo, el contenido de azúcares totales es menor en la final (58,3 %) con respecto a la rica (86,10 %). Reviste gran interés para el fabricante extraer la mayor cantidad de azúcar posible de la miel rica (Martín, 2004).

1.12- Empleo del hidrolizado de levadura en la formulación de medios.

La fuente de nitrógeno orgánico más empleada para el cultivo microbiano son los extractos de levadura, extractos de carne y peptona, así como algunos licores de granos. Todos ellos se obtienen mediante procesos con variada complejidad tecnológica y componentes de costos.

La utilización de productos obtenidos a partir de levaduras para la formulación de medios de cultivos es de gran aceptación, debido a su composición aminoacídica, siendo unos de los procesos más utilizados para liberar esos aminoácidos la hidrólisis ya se enzimática, ácida o básica (Serrano et al., 2005). Entre los autores más reconocidos en la obtención de hidrolizados de levaduras por diferentes metodologías se encuentran: Rinsum *et al.* (1991), quienes desarrollaron por hidrólisis básica un método para extraer mananoproteínas de

la pared de *S. cerevisiae* y posteriormente, separaron la mezcla de oligosacáridos por cromatografía de afinidad con sepharosa 6L unida a concanavalina A.

Lupashin *et al.* (1992) emplearon la hidrólisis térmica para obtener una nueva glicoproteína de la pared de *S. cerevisiae*. La posterior purificación de ésta la realizaron mediante electroforesis en SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

Houng *et al.* (1994) desarrollaron un método para extraer, mediante hidrólisis, los componentes de la pared de una cepa de *S. cerevisiae*. Para ello, estos autores utilizaron una combinación de hidrólisis básica con hidrólisis enzimática y alcanzaron un alto rendimiento de β 1-3 y β 1-6 glucanos, quitina y manano-proteínas. Similares resultados obtuvieron Hartland *et al.* (1994), pero en este caso mediante hidrólisis básica (con NaOH), precedida por la destrucción mecánica con agitador rotatorio y perlas de vidrio.

La variación de la composición de los polisacáridos contenidos en la pared celular de *S. cerevisiae* se estudió por Aguilar-Uscanga y Rodríguez (2017) con el empleo de la hidrólisis ácida. Para ello, los extractos de pared se hidrolizaron con ácido sulfúrico al 72% y los resultados mostraron que la composición de estos polisacáridos varió considerablemente con las modificaciones del medio de cultivo (fuente de carbono y pH).

Vera *et al.* (2021) empleó un medio de cultivo con materias primas de bajo costo a partir de la melaza (20 %), suero de leche (33,0 %) y levadura hidrolizada (10,36) (MLS) para el crecimiento de *L. plantarum*; como control se empleó el medio de referencia Man Rogosa Sharpe (MRS). Se evaluaron la cinética de crecimiento, la determinación del pH y la producción de ácido láctico. En ambos medios se obtuvieron valores de crecimiento superiores a 10^{12} UFC mL⁻¹ a las 48 h; se observó una disminución del pH a 3,11 en el medio MLS; 4,01 en MRS y la producción de ácido láctico fue de 3,28 g.L⁻¹ y 2,69 g.L⁻¹ respectivamente.

Serrano *et al.* (2005) utilizaron el hidrolizado básico de levadura como sustituto de la fuente nitrogenada del medio tradicional MRS (extracto de levadura, extracto de carne y peptona) en la formulación del PROBICID. Se obtuvieron como resultados una ligera afectación de los parámetros cinéticos, la producción de biomasa y ácido láctico que no muestran diferencias significativas por lo que se cumple ampliamente con los requerimientos establecidos para su empleo en la producción del probiótico, lo que unido al menor costo de la fuente de nitrógeno

permite utilizarla en la formulación de los medios de cultivo para la obtención de ambos biopreparados.

Materiales y métodos

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31.

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas.

2.1.1- Inóculo microbiano

Para realizar la optimización del medio de cultivo, se utilizó la cepa L31 procedente del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii*. Estudios preliminares con este microorganismo corroboraron que por sus características morfológicas y bioquímicas pertenece al género *Lactobacillus* spp. (bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa y oxidasa negativos). La preparación del inóculo se efectuó a partir de un cultivo en caldo MRS con 18h de incubación a 37°C en condiciones estáticas, con una concentración microbiana de 10⁹ UFC. mL⁻¹.

2.1.2- Composición del medio y condiciones de fermentación.

Para diseñar el nuevo medio de cultivo se tomó como medio base el caldo MRS cuya composición por litro es la siguiente: dextrosa, 20 g; peptona, 10 g; extracto de carne, 8 g; extracto de levadura, 4 g; citrato de amonio, 2 g; acetato de sodio, 5 g; K₂HPO₄, 2 g; MgSO₄.7H₂O, 0,2 g; MnSO₄. H₂O, 0,05 g y Tween 80, 1 g (BioCen). En dicha formulación se realizó la sustitución de la fuente de carbono (dextrosa) por miel final de caña y las fuentes de nitrógeno (peptona, extracto de carne y extracto de levadura) por un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (HELSc), el que se elaboró con la metodología propuesta por (Pérez, 2000).

La composición del medio que se diseñó para el crecimiento de la cepa L31 (MCL31) se expresa en la tabla 1.

Tabla 1. Formulación del medio MCL31.

Composición	g L ⁻¹
Miel final de caña (36 % azúcares reductores totales)	X ₁
HELSc (8.8 % nitrógeno total)	X ₂
K ₂ HPO ₄	2
Citrato de Amonio	5
Acetato de Sodio	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ . H ₂ O	0,02

pH 6,5

2.1.3- Diseño experimental

Se empleó el método de superficie respuesta (Box *et al.*, 1978) con un diseño experimental compuesto central rotativo 2³ y tres repeticiones en el centro del plan. Las variables independientes fueron azúcares reductores totales (X₁), nitrógeno total (X₂) y volumen del inóculo (X₃). La variable respuesta (Y) fue el conteo de las UFC.mL⁻¹.

A partir de la definición de los niveles de las variables independientes (tabla 2), se empleó el programa *Statgraphics Plus* versión 5.1 (2002) para crear el diseño de la matriz codificada, que muestra las combinaciones que debían ejecutarse. El programa también desarrolla un análisis de regresión múltiple para obtener una ecuación polinomial de segundo orden: $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$.

Tabla 2. Niveles de azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) e inóculo a emplear en el diseño.

Factor (mL.L ⁻¹)	Mínimo (-1)	Medio (0)	Máximo (1)
X ₁ : ART	15	20	25
X ₂ : NT	2	3	4
X ₃ : volumen de inóculo	5	10	15

El número de experimentos, que debían realizarse para este tipo de diseño, se determinó según la siguiente expresión:

$$N_{exp} = 2^k + 2k + N_0$$

Donde N_{exp} = Número de experimentos, k = Número de variables independientes, $2k$ = Número de puntos estrellas del experimento (son los experimentos que se desarrollan en una zona alejada del centro de éste) y N_0 = Número de puntos en el centro del plan. Al sustituir por los datos del presente diseño se obtuvo que:

$$N_{exp} = 2^3 + 2 \cdot 3 + 2 = 16 \text{ experimentos.}$$

- **Procedimiento experimental**

En cada corrida experimental se utilizaron erlenmeyers (100 mL de volumen efectivo) con los mismos componentes del caldo MRS, pero se variaron las concentraciones de las variables independientes según la matriz codificada. Se ajustó en cada uno el pH inicial de la fermentación (6,5) y se procedió a su esterilización (15 min a 1,5 atm). Posteriormente, se inocularon al 10 % con el cultivo L-31 y una vez que transcurrieron 24 h a 37 °C, se tomaron muestras del biopreparado para realizar el conteo de las UFC a través del método de las diluciones seriadas en una relación de inoculación de 1:10 (v/v) en agua de peptona (BioCen), desde 10^{-1} hasta 10^{-12} , generalmente. Las tres últimas diluciones se inocularon individualmente (1 mL) a profundidad en placas con agar MRS. Esta operación se replicó tres veces y las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 48 h. Posteriormente, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias.

- **Análisis estadístico y decodificación de las variables**

Los resultados del conteo de las UFC.mL⁻¹ se transformaron a LN. Se evaluó la significación de cada uno de los parámetros del modelo y se determinó la superficie de respuesta con el uso del programa *Statgraphics Plus* versión 5.1 (2002). A partir del modelo se determinaron los valores óptimos de las variables independientes.

Para realizar la decodificación de las variables se empleó la siguiente fórmula (Bacon y Henson 1971):

$$X_C = \frac{X_D - \frac{1}{2}(X_{\text{alta}} + X_{\text{baja}})}{\frac{1}{2}(X_{\text{alta}} - X_{\text{baja}})}$$

Donde X_C = variable codificada y X_D = variable decodificada.

2.2- Estudio de la dinámica de crecimiento y disminución del pH de la cepa L31 en el nuevo medio de cultivo.

En este ensayo se modeló el crecimiento de la cepa en estudio en el caldo MRS (medio de referencia) y en el nuevo medio de cultivo (MCL31).

A partir de un cultivo de 18 horas (6 Log UFC. mL⁻¹) en caldo MRS, las cepas se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en 42 frascos que contenían 100 mL de caldo MRS (21 con medio de referencia) o MCL31 (21 frascos) a pH 6,5. Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones estáticas. Para realizar los muestreos cada 4 h (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) se desarrollaron 3 réplicas por cada tiempo, las que se retiraron en el momento de aplicación de las técnicas de análisis. El conteo de las UFC se realizó por el método de las diluciones seriadas como se explicó en este capítulo.

Para determinar la existencia de diferencias en el crecimiento y la disminución del pH de los dos cultivos en cada tiempo de muestreo, los datos fueron procesados mediante ANOVA de clasificación simple o multifactorial y la prueba de Rangos Múltiples de Scheffe (P<0,001).

Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d):

A partir del programa Microsoft Excel y los datos obtenidos de la cinética de crecimiento, se confeccionaron las curvas de dispersión y mediante la aplicación del método de ajuste se obtuvieron los polinomios correspondientes y los valores de la velocidad específica de crecimiento. El tiempo de duplicación se determinó a través de la siguiente fórmula: $t_d = \ln 2 / \mu$ (Madigan *et al.*, 1997; León *et al.*, 2013). Las unidades de medida para cada una de estas variables son: velocidad específica de crecimiento (h⁻¹) y tiempo de duplicación (h).

Determinación del pH: A cada muestra se le midió el pH con un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

Resultados y discusión

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1– Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31.

Entre los medios más empleados para la obtención de biomasa de *Lactobacillus* spp. en condiciones de laboratorio se encuentra el Man Rogosa y Sharpe (MRS), sin embargo, su costo se eleva cuando se produce a una escala mayor para obtener grandes cantidades y producir un probiótico comercial (Santos *et al.*, 2016). Debido a esta situación, la selección de medios adecuados y económicos para las producciones a escala industrial es un aspecto importante en la obtención de estos biopreparados. La mayoría de las investigaciones se enfocan, según la cepa que se utilice, en la optimización de los medios por la metodología de superficie de respuesta a través de la sustitución de la fuente de carbono y la nitrogenada por materias primas de bajo costo y alta disponibilidad (Sosa *et al.*, 2018)

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se utilizan para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por varias variables explicativas. El objetivo principal de RSM es utilizar una secuencia de experimentos diseñados para obtener una respuesta óptima. Este método fue introducido por Box y Wilson (1951). La idea es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Berger *et al.*, 2018).

En la tabla 3 se reflejan los resultados del conteo de UFC.mL⁻¹ en cada una de las 16 combinaciones.

A partir del programa *Statgraphic* se desarrolló el análisis de los resultados. El modelo estimó, según los datos experimentales, que el conteo de las UFC.mL⁻¹ tuvo un valor máximo cuando X₁, X₂ y X₃ presentaban las concentraciones óptimas que se muestran en la tabla 4.

Tabla 3. Matriz codificada y resultados del conteo de UFC.mL⁻¹ (transformados a LN) para el cultivo de la cepa L31 según diseño compuesto central rotativo.

	X ₁ (ART)	X ₂ (NT)	X ₃ (INÓCULO)	LN UFC.mL ⁻¹		
				Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
1	20	3	1,59	22,12	22,62	22,82
2	28,4	3	10	27,98	27,38	27,28
3	25	4	5	24,89	24,89	24,59
4	15	4	15	24,89	24,46	24,39
5	15	2	15	24,67	24,97	24,47
6	11,59	3	10	22,56	22,46	22,16
7	15	2	5	22,56	22,36	22,46
8	20	1,32	10	26,67	26,51	26,37
9	25	2	5	25,54	25,21	25,94
10	20	3	10	27,45	27,12	27,65
11	20	4,68	10	27,98	27,58	27,78
12	25	4	15	26,83	26,13	26,63
13	25	2	15	24,78	24,98	24,28
14	20	3	10	27,98	27,33	27,68
15	15	4	5	22,89	22,19	22,99
16	20	3	18,409	25,76	25,12	25,26

Tabla 4. Valores óptimos para cada componente en el medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L-31.

Variable	Óptimo
X ₁ : Azúcares reductores (g.L ⁻¹)	22,63
X ₂ : Nitrógeno total (g.L ⁻¹)	3,61
X ₃ : Inóculo (mL)	11,17

En la figura 1 se aprecian los valores óptimos para cada uno de los factores, observándose la concavidad en los máximos.

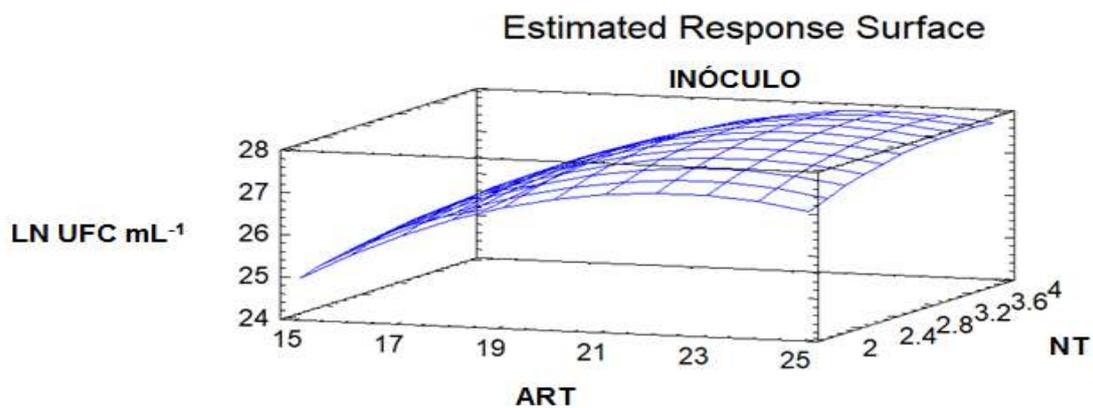


Figura 1. Influencia de los azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) y el inóculo en la variable respuesta LN UFC.mL⁻¹ de la cepa L31.

En la tabla 5 se muestra el análisis de varianza para la variable evaluada ante diferentes factores.

Tabla 5. Análisis de varianza para la Variable LN UFC.mL⁻¹.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
A: X ₁	54.8165	1	54.8165	124.77	0.0000
B: X ₂	2.40381	1	2.40381	5.47	0.0250
C: X ₃	21.0971	1	21.0971	48.02	0.0000
AA	32.1533	1	32.1533	73.18	0.0000
AB	0.352837	1	0.352837	0.80	0.3761
AC	4.0262	1	4.0262	9.16	0.0045
BB	2.59291	1	2.59291	5.90	0.0202
BC	1.93234	1	1.93234	4.40	0.0431
CC	53.3284	1	57.3284	130.49	0.0000
Bloques	0.581067	2	0.290533	0.66	0.5223
Total error	15.8165	36	0.439348		

Total (corr.) 172.974 47

R² = 90.8561 percent

R² (ajustado) = 88.6905 percent

Error estándar de la estimación. = 0.662834

Error absoluto medio = 0.471399

Estadística de Durbin-Watson = 2.43467 (P=0.0397)

Lag 1 residual autocorrelacion = -0.22205

La tabla ANOVA divide la variabilidad de LN UFC.mL⁻¹ en partes, separadas en piezas para cada uno de los efectos. A continuación, prueba el significado estadístico de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso, 4 efectos tienen valores de P inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza.

El estadístico R² indica que el modelo ajustado explica 90,86% de la variabilidad en LN UFC.mL⁻¹. El estadístico R² ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 88,69%. El error estándar de la estimación muestra la desviación estándar de los residuos igual a 0,66. El error absoluto medio (MAE) de 0,47, es el valor promedio de los residuos. La estadística de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en que ocurren en el archivo de datos. Dado que el valor P es inferior a 0,05, hay una indicación de posible correlación.

Este panel muestra la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:
$$\text{Var}_1 = -5.00621 + 2.04337*\text{Factor}_A + 1.02239*\text{Factor}_B + 1.44991*\text{Factor}_C - 0.0430236*\text{Factor}_A^2 + 0.02425*\text{Factor}_A*\text{Factor}_B - 0.0163833*\text{Factor}_A*\text{Factor}_C - 0.305444*\text{Factor}_B^2 + 0.05675*\text{Factor}_B*\text{Factor}_C - 0.0574488*\text{Factor}_C^2$$

Los lactobacilos requieren medios complejos con diversos aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento, carbohidratos fermentables, etc., que estimulan su crecimiento (Liew *et al.*, 2005). La formulación del nuevo medio de cultivo se condujo principalmente para la composición de fuentes de carbohidratos y proteínas. Se conoce que la miel final de caña de azúcar posee en su composición sacarosa, glucosa y fructosa (Sosa *et al.*, 2018). Estos carbohidratos aportan altas concentraciones de ART, los cuales pueden utilizarse por los microorganismos como fuente de energía. Por su parte el hidrolizado de levaduras presenta en su composición entre 16 y 20 % de NT, por lo que constituye una alternativa para la incorporación de fuentes nitrogenadas en los medios de cultivo. En Cuba, Milián *et al.* (2004) validaron este hidrolizado como sustituto del extracto de levadura en diferentes medios de cultivo

microbiológicos, entre los que se encontraba el medio MRS para el cultivo de lactobacilos.

Se reconoce por otros investigadores que los biopreparados probióticos deben presentar una concentración de 10^9 UFC. mL⁻¹ para ser aplicados a los animales (Brizuela, 2003). En el presente experimento se obtuvieron conteos de viables superiores a 1×10^{12} UFC.mL⁻¹, por lo tanto, las concentraciones de ART y NT que se estimaron, resultaron óptimas para producir el medio de cultivo que posteriormente se utilizará en la elaboración del biopreparado. Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por Vera *et al.* (2021).

3.2- Estudio de la cinética de crecimiento de la cepa L31 en el medio tradicional y en el MCL31.

Como se observa en la figura 2, el MCL31 resultó ser un buen medio para el crecimiento del cultivo. En este medio se obtuvieron valores superiores a 12 Log UFC. mL⁻¹ a las 24 h. Al comparar el crecimiento de las cepas en el MCL31, con respecto al crecimiento en el medio de referencia MRS, no se observan diferencias ($P \leq 0,001$). Estos resultados indican que los componentes del MCL31 como: la miel final (rica en azúcares fermentables), las sales minerales (calcio, fósforo y magnesio) y el hidrolizado enzimático de levaduras (aporta aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y oligosacáridos de glucano y manano), suplieron los requerimientos nutricionales de los microorganismos de forma similar al medio MRS (Pérez, 2000; Sosa *et al.*, 2018).

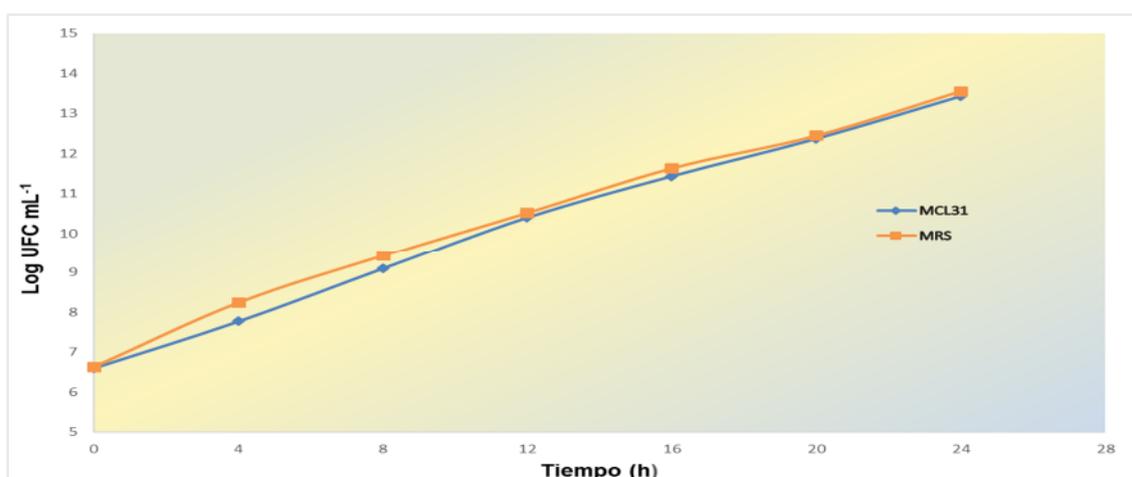


Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa L31 en los medios MRS y MCL31 ($P < 0,001$).

En las figuras 3 y 4 se muestran las líneas de tendencia con sus respectivas ecuaciones de regresión y los valores de R^2 del cultivo de la cepa L31 en los medios MCL31 y MRS.

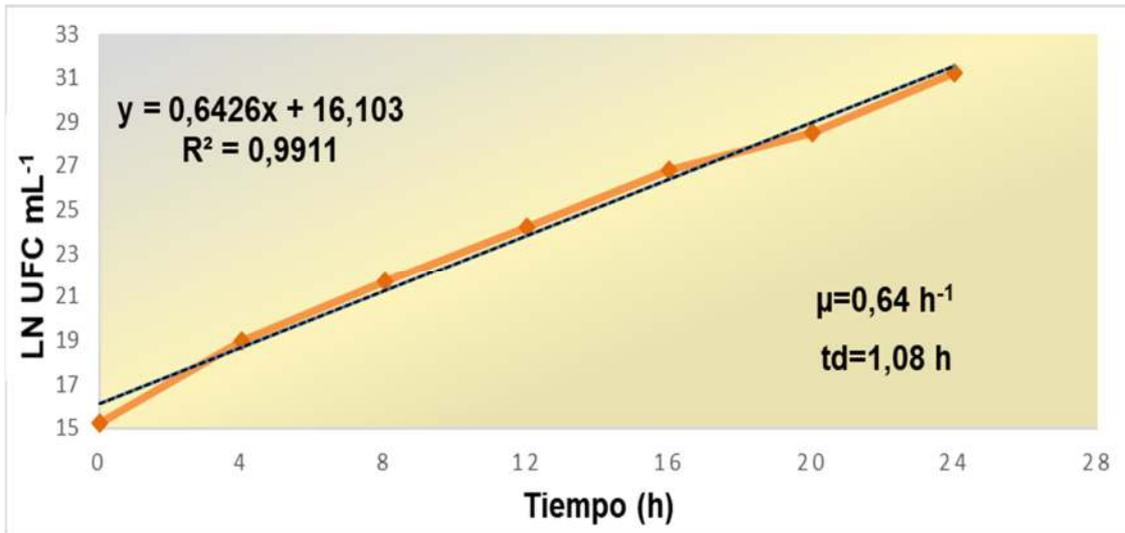


Figura 3. Gráficos de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa L31 en el medio MRS ($P < 0,001$).

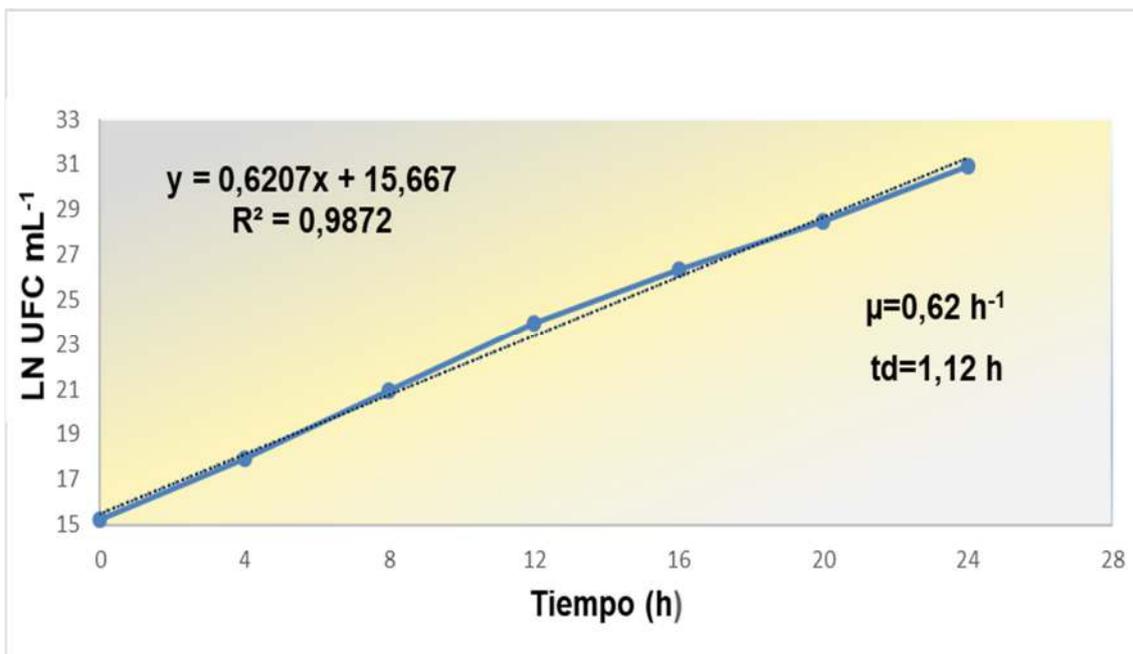


Figura 4. Gráficos de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento de la cepa L31 en el medio MCL31 ($P < 0,001$).

En la tabla 6 se presentan los resultados del cálculo de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de L31 en los medios de cultivos que se emplearon. Los resultados confirman que no existen diferencias significativas en la cinética de crecimiento de ambos medios y que la sustitución de las fuentes de nitrógeno y carbono por materias primas menos puras y más asequibles, no produjo una afectación sensible de la concentración de la población microbiana y a la velocidad de crecimiento de las bacterias.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la cepa L34 en los medios MRS y MCL34.

Cepa	Medios	Velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})	R ²	Tiempo de duplicación (h)
L31	MRS	0,64	0,99	1,08
	MCL31	0,62	0,98	1,12

La velocidad de crecimiento es un factor importante en el predominio de los microorganismos en un ecosistema y esta característica es esencial en la selección de un microorganismo probiótico. Rojas *et al.* (2021) definen que cuando se evalúan las potencialidades de las cepas candidatas a probióticas se debe comprobar que estas presenten una alta velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación igual o cercano a una hora. De esta manera, los microorganismos que se utilicen, tendrán mayores posibilidades de duplicarse rápidamente en el TGI y lograrán su predominio en este ecosistema. En este sentido se demostró en el presente trabajo, que esta cepa presenta esta característica.

Se corroboró que en las condiciones experimentales establecidas, a las 4 horas, las dos cepas estaban en la fase logarítmica o exponencial y que ésta se prolonga más allá de las 24 horas. Resulta importante definir estos resultados, ya que son determinantes en el establecimiento del tiempo que debe estar activado el cultivo a escala de laboratorio, para obtener la población de células probióticas necesarias.

Tuorila y Gardello (2002) propusieron que los jugos de frutas y vegetales podían servir como componentes de los medios de cultivo para el crecimiento de probióticos. Por otra parte, Pérez (2000) sugirió que el hidrolizado de levaduras,

específicamente de *Saccharomyces cerevisiae*, estimula el crecimiento de los lactobacilos.

Yoon *et al.* (2005), en la búsqueda de medios de cultivo para el crecimiento de lactobacilos, utilizaron jugo de remolacha y concluyeron que éste puede servir como medio natural para elaborar los cultivos probióticos, ya que obtuvieron altos valores de producción de ácido, una disminución notable del pH (menor de 4,5) y un conteo de células viables de 9 Log UFC.mL⁻¹. Con la utilización del MCL31 se obtuvieron resultados superiores a los que refirieron estos autores, probablemente por diferencias en la concentración de carbohidratos fermentables.

Vera *et al.* (2021) obtuvieron características de crecimiento similares en un medio donde fue sustituida también la fuente de carbono y nitrógeno con materias primas alternativas. En este caso se alcanzaron concentraciones celulares superiores a 12 Log UFC mL⁻¹ a las 48h en este medio.

En la figura 5 se presentan los resultados correspondientes a la disminución del pH por la cepa L31 en los dos medios que se utilizaron. Los valores alcanzados fueron 4,23 el MRS y 4,32 para el MCL31, tendencia característica de este género microbiano.

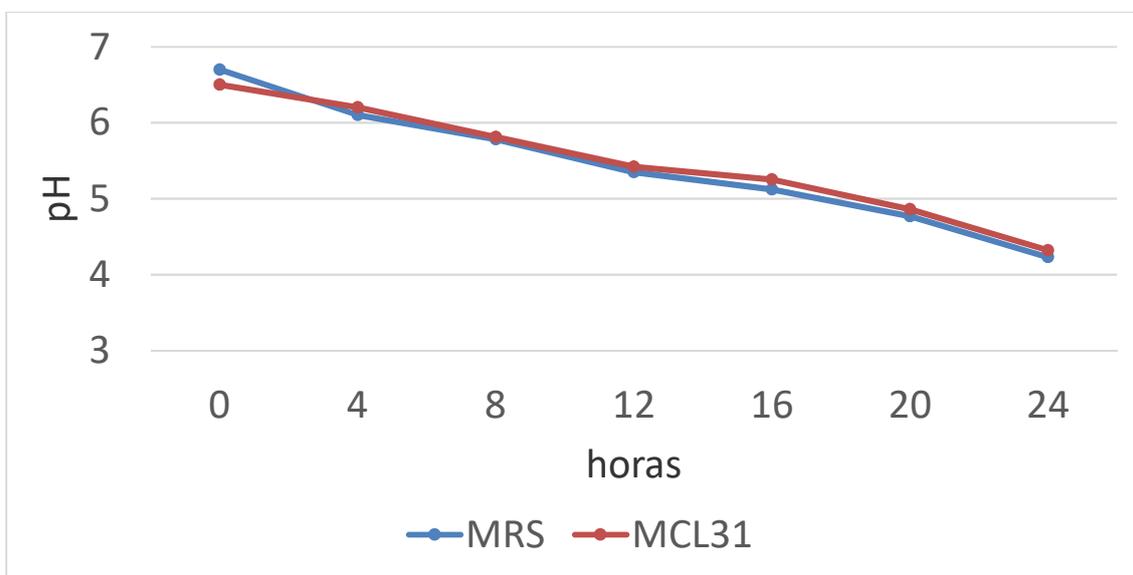


Figura 5. Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento (P<0,001).

En una investigación donde se utilizó la leche y el suero como fuente económica de nutrientes frente a una cepa de *Lactobacillus* spp. aislada del pulque, se

detectó que el pH del medio descendió de 6,4 a 4,1 durante la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo, comportamiento que es superior al reportado en este estudio (León *et al.*, 2013). Un patrón similar alcanzó Vera *et al.* (2021) quien detectó una disminución del pH de 6,5 a 3,11.

Los resultados de este experimento validan la utilización del MCL31 para la elaboración del biopreparado a escala de laboratorio. El empleo de este medio de cultivo para el crecimiento de la cepa L31 posibilitará la obtención de productos biológicos con componentes nacionales de bajo costo y sustituirá el uso del MRS como medio tradicional para el crecimiento de lactobacilos.

3.3- Evaluación económica del costo de producción del biopreparado probiótico a escala de laboratorio

Para determinar el costo de producción de los biopreparados a escala de laboratorio se procedió a la búsqueda de la información económica necesaria para cada uno de los elementos o componentes que intervienen en el proceso.

En la tabla 7 se muestra un resumen de los aspectos que se tuvieron en cuenta para la determinación del costo de producción para 5 L del biopreparado, a escala de laboratorio.

Como se puede apreciar, el medio de cultivo empleado incide en los bajos costos de los biopreparados a escala de laboratorio. Se debe recordar que el MCL31 se formula con miel final de caña de azúcar e hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como fuentes de carbono y nitrógeno. Con la inclusión de estos componentes se sustituye la glucosa, extracto de levadura, peptona y extracto de carne, que son productos más costosos y de menor disponibilidad.

Tabla 7. Costo de producción de los biopreparados a escala de laboratorio (5L).

Descripción	Cantidad	UM	Precio MN	Cantidad a utilizar	UM	Importe MN
Miel final	1000	kg	1500	0,315	Kg	0,47
HELSc	1	L	28,72	0,2	L	5,75
KH ₂ PO ₄	500	g	528	10	g	-
MnSO ₄ .H ₂ O	1000	g	92,42	0,0010	g	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	1000	g	35,92	0,00020	g	-
TOTAL						6,21
Inóculo						
Caldo MRS	500	g	149,37	5,12	g	1,53
Agua destilada	0,1	L	17,50	0,1	L	0,00175
TOTAL						1,53
Energía	-	kW/h	-	-	Kw/h	21,12
Salario	-	\$	-	-	-	123,3
Total (5 L)	-	-	-	-	-	152,15
Total (1 L)						30,43

Unidad de medida, **UM**; Moneda Nacional, **MN**.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Se demostró que el nuevo medio de cultivo MCL31 que se diseñó y optimizó con componentes de origen nacional, constituye un medio adecuado para el crecimiento de la cepa L31, ya que los microorganismos manifiestan velocidades de crecimiento similares a las que se obtienen cuando se utiliza el medio MRS o medio de referencia.
2. La velocidad de crecimiento obtenida en el medio de cultivo MCL31 fue de $0,64 \text{ h}^{-1}$ con un td de 1,12 h y en el medio MRS la velocidad de crecimiento fue de $0,62 \text{ h}^{-1}$ con un td de 1,08 h.
3. Se demostró que con la introducción del nuevo medio de cultivo en la elaboración de los biopreparados, el costo de producción disminuye y se asegura contar con un suministro estable de materias primas.

Recomendaciones

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio de la cinética del microorganismo que abarque hasta las 48 horas para observar todas las fases de la curva de crecimiento.
- 2- Determinar la estabilidad en el tiempo del biopreparado obtenido.

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albo, G.N., Henning, C., Ringuelet, J., Reynaldi, F.J., De Giusti, M.R y Alippi, A.M. 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*. 34, 417–427. doi:10.1051/apido:2003040.
- Anido, M. 2013. Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. Tesis en opción al título de Máster, PEDECIBA. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estabe. P 22. doi:https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/3996/1/uy24-16467.pdf
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J y Zunino, P. 2012. American Foulbrood in Uruguay: Twelve years from its report. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110:129-131. doi:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201112000377.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C., Martin-Hernandez, R., Higes, M y Zunino, P. 2013. Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. INIA Serie de difusión N°41. doi:https://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/fpta%2041_2013.pdf
- Arredondo, D., Castelli, L., Porrini, M.P., Garrido, P.M., Eguaras, M.J., Zunino, P y Antúnez, K. 2017. Lactobacillus kunkeei strains decreased the infection by honey bee pathogens Paenibacillus larvae and Nosema ceranae. *Beneficial Microbes*. ISSN 1876-2883 print, ISSN 1876-2891 online. doi:https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/75408.
- Arredondo, D., Castelli, L., Porrini, M.P., Garrido, P.M., Eguaras, M.J., Zunino, P y Antúnez, K. 2018. Lactobacillus kunkeei strains decreased the infection by honey bee pathogens Paenibacillus larvae and Nosema ceranae. *Beneficial microbes*. 9(2): 279-290. doi:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29264966/.
- Arribillaga, M. 2021. Manejo de la loque americana en Argentina, desde su introducción a la actualidad. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122658>.
- Audisio, M.C. 2017. Microorganismos beneficiosos para la abeja melífera, pág 11.
- Bacon, D.W. y Henson, T.L. 1971. Statistical Design and model Building. Dept of Chemical Engineering Queen's University, Kingston, Ontario, Canada. P.57
- Badia, R., Brufau, M., Guerrero-Zamora, A., Lizardo, R., Dobrescu, I., Martin Venegas, R., Ferrer, R., Salmon, H., Martínez, P y Brufau, J. 2012. β Galactomannan and Saccharomyces cerevisiae var. boulardii modulate the immune response against Salmonella enterica serovar Typhimurium in

porcine intestinal epithelial and dendritic cells. *Clin. Vaccine Immunol.* 19(3): 368-376. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22301691/>. Revisar los nombres.

- Bava, R., Castagna, F., Carresi, C., Cardamone, A., Federico, G., Roncada, P., Palma, E., Musella, V y Britti, D. 2022. Comparison of Two Diagnostic Techniques for the *Apis mellifera* Varroaosis: Strengths, Weaknesses and Impact on the Honeybee Health. *Vet. Sci.* doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35878371/>.
- Berger, P.D., Maurer, R.E., Celli, G.B. 2018. Experimental design with applications in management, engineering and the sciences. Springer International Publishing. doi: <https://pdfcoffee.com/paul-d-bergerrobert-e-maurergiovana-b-celli-auth-experimental-design-with-applications-in-management-engineering-and-the-sciences-2018-springer-international-publishing-pdf-free.html>.
- Berman, J. 2011. Desarrollo de alimento animal melazado, y enriquecido a partir de insumos no-convencionales y subproductos de la caña de azúcar para engorda de ganado bovino en la etapa de finalización. Tesis en opción al título de Máster en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional, MEX. doi:<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/11785/Tesis%2C%20Josu%C3%A9%20Berman.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Bogusz, M., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z y Al-Tufail, M. 2004. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography B.* 807: 343–356. doi:<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15203049>.
- Box, G.E.P. y Wilson, K.B. 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series, B*, 13, 1-45. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G y Hunter, J.S. 1978. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building.* John Wiley y Sons, New York, USA.
- Bravo Garrido, J y Jessica, A. 2014. Caracterización de un aceite esencial obtenido desde una especie vegetal nativa con efecto antifúngico frente a patógenos emergentes en el sector apícola, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/185138>.
- Brizuela, M. A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis en opción al grado científico de Dr. C. Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 102p.
- Cabello, A. 1980. Utilización de los subproductos de la industria azucarera en la alimentación animal. Derivados de la caña de azúcar. *ICIDCA*: 393-419.

- Calderón, R.A., Ramírez, M., Ramírez, F y Villalobos, E. 2014. Efectividad del ácido fórmico y el timol en el control del ácaro Varroa destructor en colmenas de abejas africanizadas. *Agron Costarricense*. 38(1):175-88. doi: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242014000100011&script=sci_abstract&lng=es.
- Cross, M.L. 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Medical Microbiology and Immunology*. 34, 245-53. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12443824/>.
- Dafar, A. 2018. Review of Economical and Ecological Importance of Bee and Bee Products in Ethiopia. *J. Animal Husbandry and Dairy Sci*. Volume 2, Issue 2, PP 18-26. doi: <https://sryhwapublications.com/journal-of-animal-husbandry-and-dairy-science/pdf/v2-i2/3.pdf>.
- Del Hoyo, M., Basualdo, M., Torres, J y Bedascarrasbure, E.L. 1998. Use of DHT-equipment of AFB-contaminated beehive materials in Argentina. *Journal American Bee*. 138 (10):738-740. doi: <https://www.semanticscholar.org/paper/USE-OF-DHT-EQUIPMENT-FOR-DISINFECTION-OF-BEEHIVE-IN-Hoyo-Basualdo/3dde8bbe2db61003de23d821cf8132cd2b1b4533>.
- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F y Van Immerseel, F. 2015. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*. 9, 43-48. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25336177/>.
- Evans, J.D y Lopez, D.L. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*. 97(3): 752–6. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15279248/>.
- Feketéné, A., Szűcs, I y Bauerné, A. 2023. Evaluation of the Pollination Ecosystem Service of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Based on a Beekeeping Model in Hungary. *Sustainability*. 15(13), 9906. doi: <https://doi.org/10.3390/su15139906>.
- Feldlaufer, M.F., Knox, D.A., Lusby, W.R y Shimanuki, H. 1993. Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie*, 24, 95–99. doi: https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1993/02/Apidologie_0044-8435_1993_24_2_ART0002/Apidologie_0044-8435_1993_24_2_ART0002.html.
- Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. 103(Suppl 1):S73–S79. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909977/>.
- Fries, I., Lindström, A y Korpela, S. 2006. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 269-274. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16420974/>

- García, Y., García, Y., López, A y Bocourt, R. 2005. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. Rev. Cubana de Cienc. Agríc. 39 (2):129-140. doi:<https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017845001.pdf>.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M y Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. J. Appl. Microbiol, 84:125-132. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15244067/>.
- Garrity, G.M., Bell, J.A y Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Release 5. P.190-195. doi: <https://laurieximenez.files.wordpress.com/2012/02/3-taxonomia-de-prokaryotes-bergeys-msb-2004.pdf>
- Genersch, E. 2010. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. ISSN 0175-7598, Volume 87, Number 1. <https://www.researchgate.net/publication/43184013>.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J y Fries, I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56, 501-511. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16514018/>.
- Gilliland, S.E. 1981. Enumeration and identification of lactobacilli in feed supplements marketed as sources de *Lactobacillus acidophilus*. Oklahoma Agric, Exp Sta Misc. Publ: 108-161. doi: https://extension.okstate.edu/programs/beef-extension/research-reports/site-files/documents/1981/rr81_18.pdf.
- Gorbach, S.L. 1991. *Lactobacillus acidophilus* strains. United States Patent, N°5, 032: 399.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C y Rotheray, E.L. 2015. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 347:1255957. doi: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1255957>.
- Hartland, R.P., Vermeulen, C.A., Sietsma, J.H y Wessels, J.G. 1994. The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 10: 1591-1599. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7725794/>.
- Higes, M., Nozal, M.J., Alvaro, A., Barrios, L., Meana, A., Martín-Hernández, R., Bernal, J.L y Bernal, J. 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. Apidologie 42: 364 - 377. doi: <https://hal.science/hal-01003561/document>.
- Hornitzky, M.A.Z y Karlovskis, S. 1988. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. Journal of Apicultural Research 28: 118-120.

doi:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00218839.1989.11100831>.

- Hornitzky, M.A.Z. 2003. Fatty acids - an alternative control strategy for honey bee diseases. Barton, ACT: Rural Industries Research and Development Corporation, Australia. (23 pp.) <https://agrifutures.com.au/product/fatty-acids-an-alternative-control-strategy-for-honeybee-diseases/>.
- Houg, J., Chen, K y Hsu, W. 1994. Optimization of cultivation medium composition for isoamylase production. Applied Microbiol Biotechnol, 31:61-64. doi: https://www.researchgate.net/publication/226385919_Optimization_of_cultivation_medium_composition_for_isoamylase_production.
- Hussain, A., Kumari, V., Meena, S y Kumar, R. 2022. A review on the role of beekeeping in economy and agriculture through bee diversity and bee-pollinated crops. Issue 2, Page No. 186-192. doi: <https://www.entomologyjournals.com/assets/archives/2022/vol7issue2/7-2-31-176.pdf>.
- Imani, A., Kalami, H., Mazaheri, J y Hamidian, G. 2022. Vairimorpha ceranae was the only detected microsporidian species from Iranian honey bee colonies: a molecular and phylogenetic study. Parasitology Research 121, 355–366. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34792656/>.
- Kandler, O y Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, Williams y Wilkins (eds.), Baltimore, p. 1208-1234. doi: https://www.researchgate.net/profile/Alaa_Niamah/post/Lactobacillus_casei_is_the_same_that_Lactobacillus_paracasei/attachment/59d64f0779197b80779a8480/AS%3A495670448869376%401495188452895/download/bergey%27s+manual+of+systematic+bacteriology+2009.pdf.
- Kefuss, J., Vanpoucke, J., Bolt, M y Kefuss, C. 2015. Selection for resistance to Varroa destructor under commercial beekeeping conditions. J. Apic. Res. 54, 563–576. doi: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2016.1160709>.
- Kloucek, P., Flesar, J y Kokoska, L. 2008. Activity of essential oils in vapour phase against Paenibacillus larvae. Planta Med, 74 - PE27. doi: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0028-1084726?device=mobile&innerWidth=412&offsetWidth=412>.
- König, H y Fröhlich, J. 2009. Lactic acid bacteria. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. 1st Ed, Ed Springer, 3-30. doi: <https://www.infowine.com/docs/front-matter.pdf>.
- Kuzyšinová, K., Mudroňová, D y Molnár, L. 2016. The use of probiotics, essential oils and fatty acids in the control of American foulbrood and other bee diseases. Journal homepage. ISSN: 0021-8839 (Print) 2078-6913 (Online). doi: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2016.1252067>.

- Kuzyšinová, K., Mudroňová, D., Toporčák, J., Nemcová, R., Molnár, L., Madari, A y Kožár, M. 2014. Testing of inhibition activity of essential oils against *Paenibacillus* larvae the causative agent of American foulbrood. *Acta Veterinaria* Brno, 83, 9–12. doi: https://actavet.vfu.cz/media/pdf/avb_2014083010009.pdf.
- Lee, K. 2005. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*. 40:1559-1564. doi:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920400250X>.
- León, D.I., Calderón, B y Martínez, A. 2013. Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. ISSN-e 1665-692X, pp 133-144 doi: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4745491.pdf>
- Li, W., Chen, Y y Cook, S.C. 2018. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *Int J Parasitol*. 48:433–44. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29452081/>.
- Liew, S.L., Ariff, A.B., Raha, A.R., Ho, Y.W. 2005. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 102, Issue 2, Pages 137-142, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.009>.
- Lupashin, V.V., Kononova, S.V., Ratner, Ye.N., Tsiomenko, A.B y Kulaev, I.S. 1992. Identification of a Novel Secreted Glycoprotein of the Yeast Shock. *Yeast*, 8: 157-169. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1574924/>.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M y Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms*. Eighth Edition, España, 153-154.
- Marche, M.G., Satta, A y Floris, I. 2019. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies. *Journal of Apicultural Research*, 58:3, 444-454. doi: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2019.1589669>.
- Martel, A., Zeggane, S., Drajudel, P., Faucon, J y Auber, T.M. 2006. Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Additives and Contaminants* 23: 265–273. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8804527/>.
- Martín, P.C. 2004. La melaza en la alimentación del ganado vacuno. *AIA*, 8(3): 3-19. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16517528/>.
- Martín, R., Bartolomé, C y Chejanovsky, N. 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1302-1329. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29575513/>.
- Mbarga, M.J.A., Zangué, S.C.D., Tatsadjieu, L.N., Zargar, M., Albert, E y Bayat, M. 2019. Producing probiotic beverage based on raffia sap fermented by *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium bifidum*. *Res. Crops*. 20(3):629-634. doi:

<https://www.researchgate.net/publication/337063555> Producing probiotic beverage based on raffia sap fermented by *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium bifidum*.

- Mendoza, Y., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S y Ojeda, M.P., Carrasco-Letelier, L. 2008. Factores predisponentes, pautas sanitarias y medidas de control que se deben integrar para manejar el control de la varroasis. Serie de Actividades de Difusión (INIA la Estanzuela), p 4.
- Milián, G., Samaniego, L.M.F., Pérez, M., Ascunce, G.S., Laurencio, M.S. y Espinosa, P.I. 2004. Hidrolizado enzimático de levadura de destilería de alcohol como componente de medio de cultivo en Microbiología. Patente solicitada, No. 2004-0208.
- Milián, Grethel; Martínez, M; Rondón, A.J y Rodríguez, M. 2023. Utilización de aditivos microbianos en la apicultura. *Cuban J. Agric. Sci.* [vol.57], e08. doi: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802023000100008&lng=pt&nrm=iso&tlng=es.
- Mudroňová, D., Toporčák, J., Nemcová, R., Gancarčíková, S., Hajdučková, V y Rumanovská, K. 2011. *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus* larvae infection in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 50, 323–324. doi: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3896/IBRA.1.50.4.11>.
- Nanetti, A., Büchler, R., Charrière, J., Friesd, I., Helland, S y Imdorf, A. 2003. Oxalic acid treatments for varroa control (a review). *Apiacta*. 38(1): 81-7. doi: <https://www.researchgate.net/publication/237411748> Oxalic acid treatments for varroa control review.
- Olivera, J. 2011. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1331/1/uy24-15316>.
- Opciones. 2018. Miel de abejas: potencial económico. Seminario Financiero y Económico de Cuba. doi:<http://www.opciones.cu/cuba/2018-0731/miel-de-abejas-potencial-economico>.
- Orlean, P. 2012. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192(3): 775–818. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23135325/>.
- Parada, R. 2020. Lifereder. Crecimiento bacteriano: curva, fases, factores. doi: <https://www.lifereder.com/curva-crecimiento-bacteriano/>.
- Pérez, A. 2017. La apicultura en Cuba y su situación actual. *Agroecología*. 12 (1): 67-73. doi: <https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/58320/1/330361-1125461-1-SM.pdf>.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.

- Pérez, M., Milián, G., Boucourt, R y Alemán, R. 2016. Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos. Revista La Técnica. ISSN: 1390-6895. doi: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6087670>.
- Pizarro, C., Sebastián, R y Martín, G. 2014. β -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?. Rev. Chil. Nutr. [online], 41(4): 439-446. doi:http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182014000400014.
- Planinc, A.G.I. 2004. Dynamics of falling Varroa mites in honeybee (*Apis mellifera*) colonies following oxalic acid treatments. Acta Vet Brno, 73:385-91. doi: <https://doi.org/10.2754/avb200473030385>.
- Ptaszynska, A.A., Paleolog, J y Borsuk, G. 2016. *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee Intestines. PLoS ONE 11(10): 1-15. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27736915/>.
- Rada, V., Havlík, J y Flesar, J. 2009. Biologicky aktivní látky ve výživě včel [Biologically active substances in bee nutrition]. Výzkumný ústav živočišné výroby; Prague: Czech Republic. (p. 52). doi: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/03/V%C4%8Dely-2009.pdf>
- Rademacher, E y Harz, M. 2006. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies a review. Apidologie 37(1): 98-120. doi: <https://doi.org/10.1051/apido:2005063>.
- Ramsey, S.D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J.D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M y Ellis, J.D. 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116, 1792–1801. doi: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1818371116>
- Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl Environmental Microbiology. 65, 3763-3767. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99697/>.
- Resa, P., Bolumar, T., Elvira, L., Pérez, G y Montero, F. 2007. Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. J. Food Eng, Vol.78, N°3, 1083-1091. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877406000161>.
- Reyna, J.H., Martínez, J.C y Silva, A. 2021. Fitoterapia una alternativa de control de plagas y enfermedades de abejas. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 8(2), 114-123. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2021.080200114>.
- Rinsum, J., Frans, M y Herman, V. 1991. Cell wall Glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9. Yeast, 7: 717-726. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1776362/>.
- Rodríguez, C y Zhurbenko, R. 2018. Manual de medios de cultivos. Cuarta edición. doi: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>.

- Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV frente a bacterias patógenas. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias, ICA Matanzas: 11. doi: <https://rein.umcc.cu/handle/123456789/31>.
- Rojas, C., Ochoa, G., Alfaro, R., Querevalú, J y Sánchez, H. 2021. Producción y evaluación de inóculos lácteos probióticos obtenidos del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) propuestos para alimentación porcina. *Rev mex de cienc pecuarias*, 12(1):120-137. doi:<https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5445>.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P y Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol*. 103 (Suppl 1): S96-119. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19909970/>.
- Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M y Sikkhamondhol, C. 2010. Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented fish. *J. Biosci. Bioengin*, Vol.110, N°5, 553-557. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20609623/>.
- Sajid, Z.N., Aziz, M.A., Bodlah, I., Rana, R.M., Ghramh, H.A y Khan, K.A. 2020. Efficacy assessment of soft and hard acaricides against *Varroa destructor* mite infesting honeybee (*Apis mellifera*) colonies, through sugar roll method. *Saudi J Biol, Sci*;27(1) :53-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.04.017>
- Salomón, R. 2018. Cuba, el potencial económico de las abejas. Fuente: Presensa Latina. Portal CUBA.CU. doi: <http://www.cuba.cu/economia/2018-07-03/cuba-el-potencial-economico-de-las-abejas/42400>.
- Sanabria, J.L., Rodríguez, T., Veliz, M.A., Llanes, J.R., Demedio, J., Lóriga, W y Álvarez, D. 2016. Parasitological diagnosis in honey bee in the territorial lab of imv of San José de las Lajas, Mayabeque. *Apiciencia* .XVIII (3): 35-46.
- Sánchez, L. 1997. Obtención, caracterización y producción a escala piloto de un polisacárido β (1,3) glucano con actividad inmunomoduladora. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. CENSA. La Habana: 103.
- Santos, M., Tymczynszyn, E., Golowczyc, M., Mobili, P y Gómez-Zaglia, A. 2016. Probiotic cell cultivation. In: *Advances in probiotic technology*. Foerst, P y Santivarangkna, C. Taylor y Francis Group, LLC, p. 45. ISBN: 978-4987-3458-5.
- Serrano, P., Brizuela, M.A., Tejeda, G., Rodríguez, R., Iglesias, I., Legrá, S y Armenteros, S. 2005. Hidrolizado básico de levadura y su aplicación en la obtención de biopreparados. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* [en línea], XXXIX(1), 3-9. ISSN: 0138-6204. doi: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120659001.pdf>.
- Sin, C et al. 2017. Reactivación de *Lactobacillus spp.* aislados de saliva y alimentos. doi:<https://revistas.unne.edu.ar/index.php/rfo/article/download/2928/2602>.

- Sosa , D., García, Y y Dustet, J.C. 2018. Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. Cuban J Agric. Sci, [online]. vol.52, n.4 [citado 2023-12-05], pp.357-373. doi: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802018000400357&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- Stephan, J.G., de Miranda, J.R y Forsgren, E. 2020. American foulbrood in a honeybee colony: spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development. BMC ecology. 20(1), 1-14. doi: <https://bmcecol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12898-020-00283-w>
- Suárez, D., Vargas, D y Estévez, Y. 2017. Sensorial description of PANMIEI as a nutritional complement. Apiciencia XIX (1):14-26.
- Swan, H y Karalazos, A. 1990. Las melazas y sus derivados. Revista Tecnología. Geplacea, No. 19, España. 78-82p.
- Traynor, K.S., Mondet, F., de Miranda, J.R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M.A.Y., Chantawannakul, P y McAfee, A. 2020. Varroa destructor: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. Trends Parasitol. 36, 592–606. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147149222030101X> .
- Truong, A.T., Kang, J.E., Yoo, M.S., Nguyen, T.T., Youn, S.Y., Yoon, S.S y Cho, Y.S. 2023. Probiotic candidates for controlling Paenibacillus larvae, a causative agent of American foulbrood disease in honey bee. BMC Microbiol. May 24;23(1):150. doi: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-023-02902-0>
- Tuorila, H. y Gardello, A.V. 2002. Consumer response to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. Food Quality and Preference 13:561-569, doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329301000763>.
- Vargas, A., Barrientos-Medina, R,C y Medina, L.A. 2021. Eficacia del timol en el control del hongo Nosema ceranae infectando abejas africanizadas. Revista mexicana de ciencias pecuarias, 12(2), 633-643. doi:<https://doi.org/1022319/rmcp.v12i2.5480>.
- Vargas, D., Estévez, Y y Suárez, D. 2017. Sensorial description of PROPOMIEL as a nutritional complement. Apiciencia. XIX (1): 27-39.
- Vázquez, A., Forsgren, E y Fries, I. 2012. Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. PMC. 7(3): e33188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3299755>
- Vera, M., Sánchez, L., Zambrano, P y Rodríguez, Y. 2021. Obtención de un candidato a probiótico de Lactobacillus plantarum 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materias primas agroindustriales. Rev Salud Anim [online], vol.43,n.3, e03. doi:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2021000300003.

- Verde, M y Bande, M.J. 2017. Principales Enfermedades de la abeja melífera. Medidas de Lucha y Control.
- Williams, G.R., Sampson, M.A., Shutler, D., Rogers, R.E.L. 2008. Does fumagillin control the recently-detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 342-44. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18550078/>.
- Williams, G.R., Shutler, D., Little, C.M., Burger-Maclellan, K.L y Rogers, R.L.E. 2011. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*, 42: 15-22. doi: <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/2010030>.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E. y Hang, Y.D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Lebensm.-Wiss, U.-Technol*, 38:73–75. doi:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643804001069>.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H y Genersch, E. 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 10, 1612-1620. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331334/>.