



Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad de Matanzas  
Centro de Estudios Biotecnológicos



*Evaluación in vivo de la toxicidad de un biopreparado  
probiótico en abejas *Apis mellifera**

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

**Autor:** Delia Rosa García Yanes

**Tutores:** Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. MVZ. Alain Vega Cárdenas

**Matanzas, 2023**



**Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Universidad de Matanzas  
Centro de Estudios Biotecnológicos**



*Evaluación in vivo de la toxicidad de un biopreparado  
probiótico en abejas *Apis mellifera**

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

**Autor:** Delia Rosa García Yanes

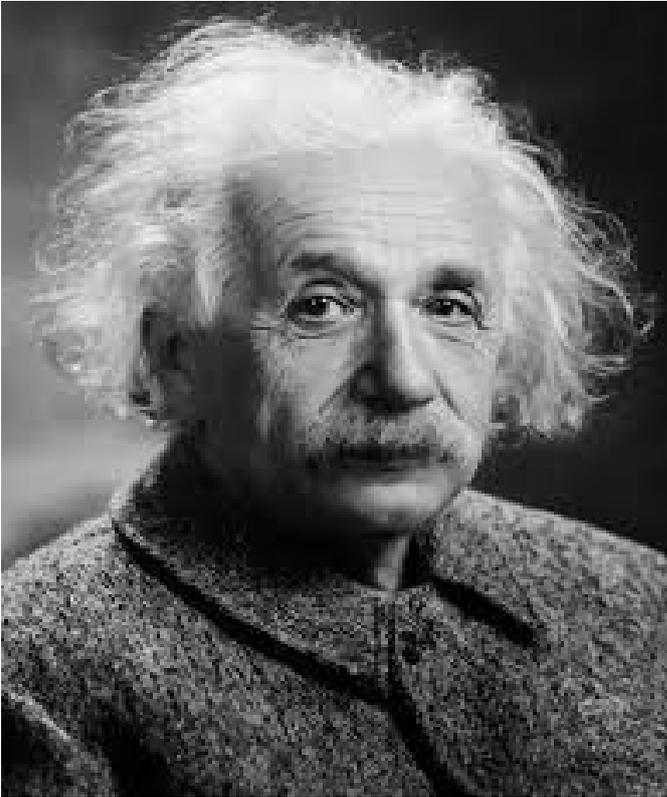
**Tutores:** Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. MVZ. Alain Vega Cárdenas

**Matanzas, 2023**

# *Pensamiento*



*"Si desapareciesen las abejas de la superficie del planeta, la humanidad solo tendría cuatro años de vida..."*

*No más abejas, No más polinización, No más animales, No más hombres..."*

*Albert Einstein.*

# *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, **Delia Rosa García Yanes** soy la única autora de este Trabajo de Diploma y que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales y la de Resultados y Discusiones de este documento provienen de las actividades de experimentación realizada durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, 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*

*Quisiera dedicar este trabajo de tesis:*

*Principalmente a Dios por haberme dado la vida, por brindarme buena salud y permitirme cumplir este gran logro, muchas gracias por ser misericordioso y darme la fuerza y el valor para salir adelante en los momentos difíciles que enfrente.*

*A toda mi familia; ya que la vida me regaló un seno familiar lleno de grandes personas, ejemplos a seguir y que con cariño me han conducido por esta vida. Por su aliento constante y apoyo incondicional.*

*En especial a mis padres, Dirma Yanes Quintero y Julio García Delgado, por ser los pilares más importantes de mi vida y por siempre estar a mi lado apoyándome y brindándome todo su amor y cariño, por ser una fuente de inspiración para seguir luchando y mejorando, por mantener siempre viva la esperanza de que lograría culminar mis estudios universitarios y estar hoy aquí realizando el ejercicio de fin de carrera.*

*A mis hermanos por todos sus consejos y todo su apoyo brindado.*

# *Agradecimientos*

*Si hoy me encuentro aquí discutiendo este Trabajo de Diploma en opción al título académico de Ingeniero Agrónomo es gracias al esfuerzo de muchas personas a mi alrededor que me apoyaron, guiaron y ayudaron a lo largo de toda mi carrera, para alcanzar las metas propuestas en mi vida y completar mi tan deseado sueño.*

*Tengo que empezar agradeciéndoles todo lo que soy a dos personas muy importantes que me dieron la vida, mis padres incondicionales que no han escatimado nunca en mi formación y exigieron siempre con las mismas fuerzas de su apoyo.*

*A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas que en mis momentos más difíciles estuvieron a mi lado y no perdieron su fe en mí, enseñándome a ser una mejor persona.*

*A la profesora MsC. Lenia Robledo Ortega por convertirse en mi guía, por su infinita confianza, por no abandonarme, por estar siempre dispuesta para mí.*

*A mis tutores, Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva, Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo y Dr. MVZ. Alain Vega Cárdenas por todo el tiempo, la paciencia y ayuda que dedicaron a mi formación profesional y a la terminación de esta tesis.*

*Agradecerle a la Revolución Cubana por darme la oportunidad de educarme y hacer gratuitamente una carrera universitaria.*

*Gracias a Dios por darme la fuerza, la sabiduría y la salud para llevar a cabo este trabajo.*

*A todos infinitas Gracias*

## *Opinión de los tutores*

A través de los años Cuba ha logrado situarse dentro de los primeros países productores de miel de abejas, con una alta productividad por colmenas. Matanzas, está considerada la mayor productora de miel del país, con cifras que superan las 1,500 toneladas anuales. La apicultura cubana moderna aspira a una producción de miel ecológica y sustentable, con abejas más productivas y resistente a enfermedades.

En este contexto el Trabajo de Diploma realizado por la estudiante Delia Rosa García Yanes responde a la “Evaluación *in vivo* de la toxicidad de un biopreparado probiótico en abejas *Apis mellifera*”. El tema abordado resulta de gran importancia en los momentos actuales, donde la comunidad científica busca alternativas para sustituir el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento animal. En este sentido, los aditivos zotécnicos juegan un importante papel, al ser productos naturales y económicamente viable para la industria biotecnológica cubana.

Por otra parte, no dejan residuos en los productos finales, estimulan la respuesta del sistema inmune y son mejoradores de la productividad animal, lo que permite, obtener animales más productivos, saludables y resistentes a las enfermedades.

La estudiante trabajó con mucha entrega, responsabilidad y sacrificio, fue receptiva a cada señalamiento y sugerencia realizada por sus tutores. Consideramos que el trabajo realizado, así como los resultados obtenidos y todo lo expuesto en la tesis que se entrega a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, sean merecedores del otorgamiento del Título de Ingeniero Agrónomo.

### **Tutores de la Tesis:**

Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. MVZ. Alain Vega Cárdenas

## Resumen

La presente tesis tuvo como objetivo evaluar *in vivo* la toxicidad de un biopreparado probiótico en abejas *Apis mellifera*. La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas, durante diez días del mes de noviembre de 2023. Se elaboró un biopreparado probiótico con la cepa *Lactobacillus* L31. Las abejas se alojaron en cajas de madera y cristal. Se utilizó hidromiel como alimento artificial para introducir el biopreparado y sus variantes, en cuatro tratamientos: T1) hidromiel (control), T2) hidromiel + biopreparado, T3) hidromiel + células de *Lactobacillus* L31, T4) hidromiel + sustancias posbióticas producidas por *Lactobacillus* L31. Se monitoreó: mortalidad, consumo del jarabe, signos de enfermedad, estado sanitario de la colonia y conteo de *Lactobacillus*. Los resultados de mortalidad y consumo se procesaron según el software estadístico STATGRAPHICS Plus. Se aplicó un ANOVA simple para comprobar diferencias entre tratamientos y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (1955). Los conteos de viables se transformaron según Log N y para su análisis, se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^x$ . Como resultado se observó que las abejas no muestran signos de intoxicación ante la ingestión de hidromiel con el biopreparado. Se redujo la mortalidad en la población de abejas y aumentó el consumo y los conteos de viables en comparación ( $P < 0,05$ ) con el tratamiento control. Se concluye que el biopreparado probiótico es un aditivo seguro e inocuo para su administración en abejas *Apis Melliferas*.

## *Abstract*

The objective of this thesis was to evaluate *in vivo* the toxicity of a probiotic biopreparation in *Apis mellifera* bees. The research was carried out in the Microbiology laboratory, belonging to the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Matanzas, during ten days in November 2023. A probiotic biopreparation was prepared with the *Lactobacillus* L31 strain. The bees were housed in wooden and glass boxes. Mead was used as artificial food to introduce the biopreparation and its variants, in four treatments: T1) mead (control), T2) mead + biopreparation, T3) mead + *Lactobacillus* L31 cells, T4) mead + postbiotic substances produced by *Lactobacillus* L31. The following were monitored: mortality, syrup consumption, signs of disease, health status of the colony and *Lactobacillus* count. The mortality and consumption results were processed according to the STATGRAPHICS Plus statistical software. A simple ANOVA was applied to check differences between treatments and Duncan's Multiple Range Test (1955). The viable counts were transformed according to Log N and for analysis, the formula (K+N) was applied. 10x. As a result, it was observed that the bees do not show signs of intoxication when ingesting mead with the biopreparation. Mortality in the bee population was reduced and consumption and viable counts increased compared (P<0.05) with the control treatment. It is concluded that the probiotic biopreparation is a safe and harmless additive for its admittance in *Apis Mellifera*s bees.

## *Abreviaturas y glosario de términos*

APC	Antibióticos Promotores del Crecimiento
CEBIO	Centro de Estudios Biotecnológicos
CUP	Moneda Nacional de Cuba
cm	Centímetro
EE	Error estándar
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
g	gramo
h	horas
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
kg	Kilogramos
L	Litro
LARISA	Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola
mL	mililitro
mm	milímetros
MINAGRI	Ministerio de la Agricultura
NG	National Geographic
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
P	Probabilidad
%	Por ciento
°C	Grados Celsius
SEFC	Seminario Económico y Financiero de Cuba
t	Toneladas
TGI	Tracto Gastro Intestinal
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
UEB Apícola	Unidad Empresarial de Base
UM	Universidad de Matanzas

# Índice

Índice	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
I.1. Historia de la Apicultura	3
I.2. Origen y desarrollo de la apicultura en Cuba	4
I.3. Clasificación taxonómica y origen de <i>Apis mellifera</i> en Cuba	7
I.4. Características morfológicas y división del trabajo de las castas	8
I.5. Crianza y cuidado de las abejas	12
I.6. Importancia de las abejas melíferas en Cuba	13
I.7. Enfermedades que afectan a las abejas <i>Apis mellifera</i>	14
I.8. Probióticos. Su empleo en la apicultura	22
I.8.1 Empleo de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Lactobacillus</i> spp. en la apicultura	24
I.9. Estudios toxicológicos en abejas <i>Apis mellifera</i>	26
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>34</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>43</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>

## Introducción

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son consideradas agentes polinizadores esenciales de cultivos comerciales y de la flora silvestre. Estos insectos forman parte de la biodiversidad de la que todos dependemos para sobrevivir. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el 75% de los cultivos alimentarios del mundo dependen de la polinización por insectos, principalmente abejas. Sin embargo, sus poblaciones están disminuyendo en todo el mundo debido a sus enfermedades, uso excesivo de pesticidas, pérdida de hábitats naturales, al cambio climático, cambios en el uso del suelo y otros factores ambientales y humanos. Ante esta situación es importante tomar medidas para proteger a las abejas y asegurar su supervivencia (FAO, 2018).

La apicultura es la técnica que se dedica al cuidado de las colmenas de abejas melíferas y reportada como una de las actividades agrícolas más antiguas del mundo. De ella, se obtiene gran cantidad de productos de interés industrial como la miel, cera, jalea real, propóleos, veneno de abejas, entre otros productos (SEFC, 2019). En Cuba, desde el año 2015 las especies de abejas son reconocidas tanto en el Decreto-Ley N°. 31 de Protección Animal (Ministerio de justicia, 2021) como en el Anteproyecto de Ley de Ganadería (MINAGRI, 2022).

La apicultura en Cuba es una actividad económica importante ya que sus producciones constituyen uno de los rubros exportables del país. Sin embargo, en los últimos años la industria apícola se ha visto amenazada por la presencia de diversos agentes patógenos causante de enfermedades que provocan alta mortalidad de las abejas y el decrecimiento del número de colmenas.

En la producción pecuaria se conoce el empleo de probióticos, pero con muy poco uso en la apicultura. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas le confieren beneficios a la salud del huésped (Milián *et al.*, 2021). Estos junto a otros productos naturales inocuos adquieren gran importancia en el tratamiento y prevención de las enfermedades en los animales.

En las abejas melíferas el uso de probióticos se ha investigado, para mejorar su sistema inmunológico y prevenir enfermedades. Estos aditivos zootécnicos ayudan a mantener el equilibrio saludable de la microbiota intestinal, lo que puede mejorar su capacidad para resistir patógenos dañinos. Además, mejorar la calidad de la miel producida por estos insectos (Rodríguez, 2018; Al-Ghamdi *et al.*, 2020).

En Cuba, el uso de probióticos en las abejas melíferas puede ser una herramienta valiosa para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y mejorar su salud. Sin embargo, es importante utilizarlos de manera responsable y segura.

### **Problema Profesional:**

El Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas (UM) obtuvo un biopreparado con potencial probiótico para su empleo en abejas melíferas. La aplicación de este producto microbiano requiere de la realización de pruebas para evaluar si existen efectos adversos para su uso en estos insectos.

### **Hipótesis**

La evaluación *in vivo* de la toxicidad del biopreparado probiótico permitirá su aplicación segura en las poblaciones de abejas *Apis mellifera*.

### **OBJETIVOS**

#### **General**

Evaluar *in vivo* la toxicidad de un biopreparado probiótico en poblaciones de abejas *Apis mellifera*.

#### **Específicos**

1. Elaborar en condiciones de laboratorio el biopreparado con potencial probiótico a partir de la cepa de *Lactobacillus* L 31 aislada del tracto digestivo de *Melipona beecheii*.
2. Evaluar "*in vivo*" la toxicidad del biopreparado probiótico sobre poblaciones de abejas melíferas en condiciones controladas.
3. Valorar el potencial económico, social y ambiental del biopreparado probiótico a nivel de producción.

## **CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I.1. Historia de la Apicultura**

La apicultura, o la cría y cuidado de las abejas para producir miel y otros productos de la colmena, es una actividad humana muy antigua que se remonta a la época prehistórica. Se han encontrado evidencias de pinturas rupestres que muestran prácticas apícolas de 7,000 u 8,000 años de antigüedad, en las que podemos observar escenas de la recolección de miel por parte de los hombres primitivos en cuevas y rocas en diferentes partes del mundo (Crane, 1999).

Sin embargo, la apicultura como actividad organizada y controlada se originó en Egipto hace más de 5.000 años. Los egipcios utilizaban las abejas para polinizar sus cultivos y producir miel, cera y propóleo, y se les criaba en colmenas de arcilla. También creían que las abejas eran sagradas y las asociaban con la diosa Isis. En la antigua Grecia, se consideraba a las abejas como un regalo de los dioses y se les atribuía propiedades curativas (Crane, 1999).

La apicultura se extendió por todo el mundo antiguo, desde Grecia y Roma hasta China y América Central. Los griegos y los romanos desarrollaron técnicas avanzadas para el manejo de las colmenas y la producción de miel, y el famoso filósofo griego Aristóteles escribió sobre la vida de las abejas en su obra "Historia de los animales", y los mayas utilizaban abejas sin aguijón para producir miel y cera (Crane, 1999).

En la Edad Media las abejas sostuvieron una significativa importancia económica, social y cultural. La constante demanda de cera fue impulsada por la práctica religiosa cristiana, además de su uso para sellos, tablillas de escritura, fundición e iluminación de lujo mientras que la miel proporcionaba el único edulcorante ampliamente accesible en una era anterior a las importaciones de azúcar a gran escala. En consecuencia, la apicultura fue una parte notable de la economía rural, aprovechando la participación de numerosos grupos en toda Europa, desde productores campesinos con unas pocas colmenas destinadas al consumo local a apicultores especializados que se dedican a la producción a gran escala. producción para un próspero comercio internacional (Sales *et al.*, 2021).

En América del Norte, las tribus nativas americanas también practicaban la apicultura y usaban la miel como alimento y medicina. Los colonos europeos trajeron sus propias colmenas de abejas con ellos a América del Norte y continuaron desarrollando la apicultura allí (Sanford, 2010).

En el siglo XVIII, se descubrieron nuevas técnicas para la producción de miel y se crearon nuevas variedades de abejas. La apicultura se convirtió en una actividad comercial y se fundaron las primeras asociaciones de apicultores. En el siglo XIX, se expandió a América del Norte y del Sur. En Estados Unidos, se desarrolló la técnica de la colmena móvil, que permitía trasladar las colmenas para aprovechar las diferentes floraciones (Sanford, 2010).

En el siglo XX, la apicultura se convirtió en una actividad industrializada y se crearon nuevas tecnologías para la producción de miel y cera. Sin embargo, también surgieron problemas como la disminución de las poblaciones de abejas debido al uso de pesticidas y la aparición de enfermedades (Sanford, 2010).

Hoy en día, la apicultura sigue siendo una actividad importante en todo el mundo, con millones de personas dedicadas a la producción de miel, cera y otros productos apícolas. La misma se ha convertido en una herramienta fundamental para la polinización de cultivos, la conservación del medio ambiente y la biodiversidad. Además, la miel y otros productos de las abejas son muy valorados por sus propiedades nutricionales y medicinales (ICA, 2022).

## **1.2. Origen y desarrollo de la apicultura en Cuba**

La apicultura en América Latina tiene una larga historia que se remonta a las culturas precolombinas. Los mayas, por ejemplo, eran conocidos por su conocimiento de la apicultura y la producción de miel. Los españoles introdujeron la apicultura en América Latina durante la colonización, y desde entonces ha sido una actividad importante en la región (Vergara, 2008).

La apicultura en Cuba es una actividad importante para la economía y la seguridad alimentaria del país. La misma se ha desarrollado significativamente en las últimas

décadas. Es una actividad agrícola que se practica desde hace más de 200 años, pero fue en la década de 1990, cuando el gobierno cubano comenzó a promoverla como una forma de diversificar la economía y la alimentación. En este sentido, se establecieron programas de capacitación y financiamiento para los apicultores, además, se fomentó la producción de miel y otros productos derivados de las colmenas (Pérez, 2015).

La apicultura cubana ha experimentado cambios significativos antes y después del Triunfo de la Revolución. Antes, la apicultura en Cuba se encontraba en un estado precario como muchos otros ámbitos agrícolas. La falta de derechos de propiedad y la inseguridad sobre la posesión de la tierra, eran problemas comunes para los apicultores cubanos. Las condiciones de explotación y exclusión derivadas de estas circunstancias se manifestaban en prácticas como el arrendamiento, la aparcería y el precarismo (Machín *et al.*, 2016).

Después del Triunfo de la Revolución, la apicultura en Cuba ha experimentado un crecimiento significativo. Según informó, Lázaro Bruno García Castro, director general de la Empresa Apícola Cubana, Apicuba, la producción de miel en Cuba logró alcanzar niveles históricos. En el año 2021, se produjo la mayor cantidad de miel de la historia: más de 10,500 t, superando el récord anterior (10,215 t) del año 1962. Además, se produjeron más de 174 t de cera, la cuarta mayor cifra de la historia de la apicultura cubana. Más de 16 t de propóleo, cifra récord, ya que el anterior fue de 14,9 t. Los rendimientos de la extracción de miel en Cuba se encuentran entre los más elevados internacionalmente, con 48 kg por colmena. Además, se ha fomentado la producción de otros productos de la colmena como el polen, del cual se obtuvieron ocho toneladas, cuando la mayor cifra producida anteriormente no sobrepasaba las cinco anuales (Sierra, 2022).

El crecimiento de la industria apícola en Cuba ha estado fuertemente influenciado por las medidas adoptadas por el estado cubano para fortalecer el sector no estatal y dinamizar las actividades agropecuarias. Esto incluye la capacidad de exportación e importación concedida a la empresa y el retorno del 80 % de la divisa obtenida

para el propio desarrollo. En el año 2021 se exportaron más de 8,500 t de miel lo que generó un ingreso al país de 23,000,000 de pesos (Sierra, 2022).

Cuba, es uno de los principales productores de miel en América Latina. El 90% de la miel cubana se exporta a Europa principalmente a Alemania, Holanda, España y Suiza y sólo el 5% se destina al mercado local (SEFC, 2019). En los últimos años, se ha incrementado el interés por la apicultura, debido a su potencial económico y su contribución al desarrollo sostenible. Esta actividad agropecuaria se ha convertido en una alternativa viable para diversificar la agricultura, proteger el medio ambiente y aportar ingresos a muchas comunidades rurales del país (Pérez-Piñeiro, 2017; Almaguer, 2018).

La industria apícola cubana se desarrolla de manera sostenible y ecológica utilizando técnicas de manejo en las colmenas que permiten la conservación de la biodiversidad y el uso eficiente de los recursos naturales. Además, el gobierno cubano promueve la investigación y el desarrollo tecnológico del sector, lo que permite mejorar la calidad de los productos y aumentar su productividad (González y Rodríguez, 2016).

Los estudios realizados sobre la apicultura en Cuba abordan temas como la historia de la apicultura en el país, su situación actual, las perspectivas de desarrollo, la caracterización de los apicultores y las abejas, y la relación entre la apicultura y la agroecología. La miel cubana se caracteriza por su alta calidad y pureza, ya que se produce principalmente a partir de flores silvestres y no se utilizan pesticidas ni otros productos químicos en su producción. Además, se exporta a diferentes países del mundo, incluyendo Europa y Asia (Pérez, 2015; Almaguer, 2018).

La apicultura es una actividad milenaria que ha evolucionado a lo largo de la historia y sigue siendo importante en todo el mundo. Cuba ha experimentado un crecimiento significativo después del Triunfo de la Revolución, con la producción de miel y otros productos de la colmena, alcanzando niveles históricos. Es una actividad relevante que requiere esfuerzos conjuntos del gobierno, los apicultores y otros actores involucrados para su desarrollo sostenible y su contribución al bienestar social y

económico del país. A pesar de enfrentar grandes desafíos como la falta de equipos y tecnologías modernas, escasez de recursos financieros y materiales, y los efectos del cambio climático busca expandirse en los mercados de exportación y fomentar la producción de otros productos de la colmena (Díaz, 2017).

### I.3. Clasificación taxonómica y origen de *Apis mellifera* en Cuba

Las abejas son insectos pertenecientes al orden de los Himenópteros. Taxonómicamente pertenecen a la familia Apidae y presentan una amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (González, 2017).

**Tabla 1.** Descripción taxonómica de las abejas.

Denominación	Descripción
Reino	Animal
Sub-reino	<i>Metazoarios</i>
División	<i>Artiozoarios</i>
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Clase	<i>Insectos</i>
Orden	<i>Himenóptera</i>
Familia	<i>Apidae</i>
Género	<i>Apis</i>
Especie	<i>Apis mellifera</i>

Fuente: Tomado de Cardinal *et al.*, (2018).

La abeja occidental, *Apis mellifera* o productora de miel, es originaria del viejo mundo, pero fue traída al continente americano por colonizadores europeos en el siglo XVII. Es la especie de abeja con mayor distribución en el mundo (Lara, 2019). Según Basualdo y Ramos (2017), entre las distintas razas de las abejas que poseen mayor importancia en la apicultura de América Latina podemos mencionar: la abeja italiana (*A. m. ligustica*), la abeja caucásica (*A. m. caucásica*), la abeja carmolos (*A.*

*m. carnica*), la abeja africana (*A. m. scutella*), la abeja Chiprista (*A. m. cypria*) y la abeja egipcia (*A. m. fasciata*).

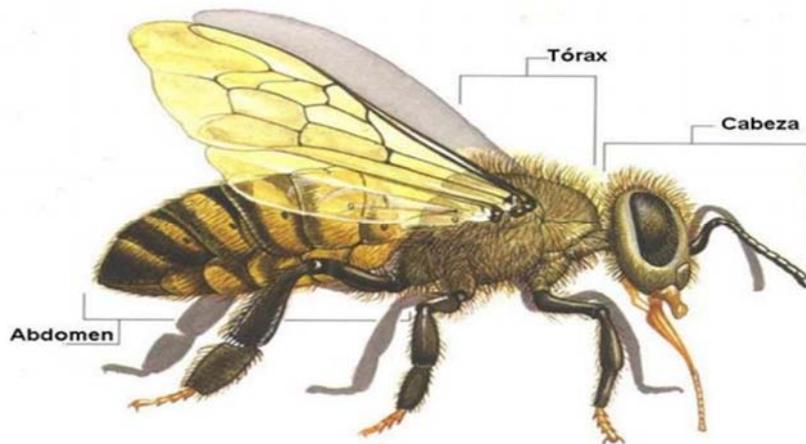
*Apis mellifera* se encuentra en muchas regiones de Europa, África y parte de Asia, fue introducida en América (incluyendo Cuba) y Oceanía. Es la especie de abeja más comúnmente utilizada en la apicultura en Cuba y llegó a nuestro país por los colonos españoles en el siglo XIX, cuando importaban colonias de abejas desde España para la producción de miel y cera. En Cuba, la abeja melífera se ha adaptado y se ha establecido en diferentes regiones del país (González, 2017).

En Cuba, también se encuentra la abeja *Melipona beecheii*; única de este tipo en la isla y los cayos adyacentes. Investigadores plantean que esta abeja pudo haber sido traída por los aborígenes que vivían en Cuba o por expediciones de civilizaciones centroamericanas que llegaron a la Isla en algún momento (Jiménez *et al.*, 2021).

*Apis mellifera* y *Melipona beecheii* son las dos únicas especies de abejas presentes en Cuba, cada una de ellas con su propia historia de origen y características (Fonte, 2022). Ambas son esenciales y tienen un gran potencial para contribuir al desarrollo económico del país y a la conservación del medio ambiente, ya que desempeñan un papel fundamental en la polinización y contribuyen significativamente a la biodiversidad y la agricultura de la región.

#### **I.4. Características morfológicas y división del trabajo de las castas**

De los millones de insectos que habitan el planeta, las abejas son las más estudiadas. El estudio de su fisiología sensorial y morfología funcional ha ocupado varias generaciones de biólogos. Su cuerpo está segmentado en tres partes principales: cabeza, tórax y abdomen (figura 1). El exoesqueleto, está compuesto de quitina, que le da la necesaria estabilidad, protege las tres grandes partes en el que se divide su cuerpo, en las dos primeras formando cajas rígidas y en la última de forma extensible (Lara, 2019).



**Figura 1.** Morfología externa del cuerpo de la abeja (Tomado de Lara, 2019).

La cabeza, es una caja quitinosa, que tiene forma de triángulo invertido, alberga los órganos de la visión (ojos simples y ojos compuestos), las antenas y el aparato bucal. Se encuentra unida al tórax por un cuello angosto y membranoso. La cabeza de esta especie varía mucho en cuanto al sitio que ocupa en la jerarquía, es hexagonal en las reinas, triangular en obreras y circular en los zánganos (Lara, 2019).

Las abejas cuentan con cinco ojos, que conforman el sentido de la visión de estos insectos, estos se dividen en tres ojos simples también denominados ocelos, de pequeño tamaño, con ellos pueden ver a corta distancia, y en condiciones de casi oscuridad en el interior de la colmena y dos ojos compuestos de gran tamaño, ubicados de forma lateral en la cabeza que permite la visión a largas distancias e identificar una amplia gama de colores (Lara, 2019).

Los órganos sensoriales más importantes son las antenas. Las abejas poseen un par de antenas largas y delgadas que permiten analizar su entorno, evidenciar cambios de temperatura, vibraciones, humedad, vientos, localizar fuentes de alimentos y mensajes químicos (Rice, 2023). Según Corona (2016), el aparato bucal de la abeja es del tipo lamedor. Se compone del labio superior o labro, la epifaringe, oculta por el labro, y un par de mandíbulas.

En las abejas el tórax, es la parte media del cuerpo, es su centro locomotor y responsable de su vuelo. Está constituido por tres segmentos. Cada segmento lleva un par de patas, y en el segundo y tercero llevan cada uno un par de alas membranosas. También disponen de espiráculos (orificios), por donde entra el aire para la oxigenación del tórax. Los tres pares de patas articuladas permiten a la abeja desplazarse por diferentes superficies y ayudar en diversas tareas, como recolectar néctar y polen. Las patas traseras de las abejas obreras, por ejemplo, tienen cestas de polen, o corbículas, que utilizan para recolectar y transportar el polen de regreso a la colmena, un par de alas membranosas y un sistema de músculos que les permite volar a gran velocidad y maniobrar con precisión (Rice, 2023).

El abdomen es alargado y flexible, se encuentra recubierto de pelos y se compone de nueve segmentos, seis visibles en las hembras y siete en los machos. Los segmentos abdominales poseen dos placas unidas por membranas flexibles, lo que les permite una gran variedad de movimientos, como alargarse o acortarse y también curvarse en cualquier dirección. El abdomen contiene órganos reproductivos, digestivos, y estructuras vitales, incluidos el aguijón y las glándulas de cera (Cepero, 2016).

Las abejas de todas las razas poseen una jerarquía bien definida. La colmena es una sociedad muy estructurada que se divide en tres castas principales: la reina, las obreras y los zánganos (figura 2). Cada una de estas castas tiene funciones específicas y su trabajo se organiza de manera que optimiza el funcionamiento de la colmena (Cepero, 2016).



**Figura 2.** División de las castas de abejas (Tomado de Lara, 2019).

En las abejas melíferas las obreras miden alrededor de 12 mm de largo, la reina mide alrededor de 18 mm de largo, y los zánganos miden alrededor de 16 mm de largo. Son de color marrón claro, pero este puede variar entre las diferentes especies y subespecies. Su anatomía está adaptada para su estilo de vida social y su capacidad para recolectar y almacenar alimentos (García, 2020).

Las castas presentan interacciones sociales complejas y un sistema cooperativo donde está bien definida la división del trabajo. Dentro de la colonia, las obreras (hembras infértiles) son las responsables de alimentar (nodrizas) a la cría joven y la reina. Además, colectan el alimento (pecoreadoras), mantienen la limpieza (limpiadoras) y defienden la colonia (guardianas). Las obreras continuamente construyen nuevas celdas de cría y demás partes del nido (constructoras). Por su parte, la reina (hembra fértil), tiene una función reproductiva (responsable de la postura de los huevos) que garantiza la perpetuación de la especie y mantiene a la colmena unida a través de la liberación de las feromonas (Blanco, 2023).

Los zánganos son las abejas machos de la colmena. Se caracterizan por su cuerpo más robusto y de mayor tamaño que las obreras. Carecen de aguijón. Alcanzan su madurez sexual a las dos semanas de nacer, y suele vivir otras tres semanas más. Su tarea es única y se basa en ser el sexo masculino de la colmena. Su función es la de transportar alimentos dentro de la colmena y calentar la cría en su proceso de nacimiento (Ivars, 2021).

Las colmenas de abejas, como insectos eusociales tienen una estructura interna organizada, con reparto de funciones y regulada químicamente por una única reina y madre de toda la colonia. La división del trabajo en la colmena es esencial para su funcionamiento y supervivencia. Cada casta tiene un papel específico que contribuye a la salud y al éxito de la colonia. Esto les permite a las abejas funcionar como un superorganismo, donde cada individuo contribuye al bienestar y supervivencia. Las abejas se comunican entre sí a través de señales químicas (feromonas) y físicas (como el baile de las abejas) para coordinar sus actividades y responder de forma eficiente a las necesidades de la colonia (Gutierrez, 2021).

## **I.5. Crianza y cuidado de las abejas**

La crianza y el cuidado de las abejas, es una práctica ancestral que ha generado millones de empleos en el mundo y con el correr de los años se ha venido modernizado para obtener productos de buena calidad como la miel, jalea real, propóleo, cera y polen, lo cual nos hace reflexionar en la importancia de la crianza de abejas para la humanidad y especialmente para el desarrollo del país (Mauricio y Valenzuela, 2022).

La crianza de abejas es una actividad especializada de la apicultura que requiere conocimientos de la biología de las abejas, de su alimentación, de la experiencia en el manejo de colmenas y de la prevención de enfermedades. Su crianza y cuidado es necesaria para realizar una mejor explotación y obtener productividad.

Para garantizar óptimas condiciones en la crianza de abejas, es necesario ubicar las colmenas en lugares adecuados para evitar la competencia con las abejas autóctonas y otros polinizadores de su área. Este lugar debe contar con acceso directo a una buena flora melífera para que las abejas puedan recolectar néctar y polen, que se encuentren protegidas de depredadores y de condiciones climáticas adversas. La colmena se puede instalar en una cavidad natural, como un hoyo en un árbol, o en una estructura construida por el apicultor (Vásquez *et al.*, 2022).

Además, es importante monitorear la cantidad de miel en la colmena y asegurarse de que las abejas tengan suficiente alimento durante todo el año ya que necesitan una dieta variada y equilibrada para mantener su sistema inmunológico fuerte y combatir las enfermedades. Su fuente de alimento incluye el néctar y el polen de las flores, así como suplementos alimenticios proporcionados por el apicultor, por eso es fundamental que se seleccione un lugar adecuado para que la colmena tenga acceso a una variedad de plantas que florezcan en diferentes épocas del año, proporcionando así una fuente constante de alimento para ellas (Vásquez *et al.*, 2022).

También es importante monitorizar su salud y tomar medidas preventivas y correctivas para controlar cualquier enfermedad que pueda afectarlas. Esto puede

incluir la inspección regular de la colmena, el uso de medicamentos de control de enfermedades y la eliminación de abejas enfermas. Durante el otoño y el invierno, las abejas experimentan una escasez de alimento debido a la falta de floración. Por lo tanto, es necesario preparar la colmena para la invernada y suplementar la alimentación con el objetivo de cubrir las necesidades provocadas por las condiciones climáticas adversas o por la propia manipulación del apicultor (Vásquez *et al.*, 2022).

### **I.6. Importancia de las abejas melíferas en Cuba**

Las abejas melíferas son vitales para la polinización y el desarrollo de cultivos para la agricultura, ganadería y alimentación. Son polinizadoras de un gran número de cosechas, por lo cual desempeñan un papel crucial en la agricultura y la biodiversidad. Alrededor del 84% de los cultivos para alimentación son polinizados por las abejas. En Cuba, la necesidad de polinizadores es mayor cada día debido al desarrollo de la agricultura urbana y suburbana (Jiménez *et al.*, 2021; Font, 2021).

La polinización que realizan las abejas melíferas se traduce en la formación de frutos y semillas de más de 250.000 especies de plantas diferentes, algunas de gran importancia para la agricultura. Más del 75% de los cultivos alimentarios del mundo dependen, en cierta medida, de la labor que realizan las abejas (Pérez, 2019).

En Cuba, La miel de abejas y sus derivados constituyen uno de los rubros exportables más importantes del Grupo Empresarial Agroforestal del Ministerio de la Agricultura. Además de las tradicionales ventas de miel y cera al exterior, se unen o sumarán láminas de cera, jalea real, suplementos nutricionales, cosméticos, propóleo y sus derivados, bebidas, velas, bombones y producciones para la industria farmacéutica. Además, la miel se destina como insumo para la producción de medios biológicos utilizados contra plagas, elaborados en Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (Salomón, 2018). Otro aspecto importante es la obtención de diferentes productos nutricionales como los complementos PANMIEL (Suárez *et al.*, 2017) y PROPIOMIEL (Vargas *et al.*, 2017).

Por otro lado, las abejas melíferas también enfrentan amenazas significativas. La contaminación, el cambio climático, el uso indiscriminado de pesticidas, la introducción de especies exóticas invasoras y la pérdida de hábitat son algunos de los factores que están contribuyendo a la disminución de las poblaciones de abejas. Para preservarlas es recomendable tomar medidas como la plantación de flores y árboles nativos que les sirvan de alimento, evitar el uso de pesticidas en jardines y plazas, y criar especies autóctonas de la región (NG, 2022).

Además de la importancia que tienen las producciones apícolas desde el punto de vista económico, diferentes instituciones como universidades, empresas apícolas estatales, campesinos apicultores, Instituto de Investigaciones Apícolas y las entidades de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) prestan atención al desarrollo de las abejas como polinizadores y mediadores de la biodiversidad a través del programa de la “Tarea vida” que tiene como objetivo mitigar las causas del cambio climático.

### **I.7. Enfermedades que afectan a las abejas *Apis mellifera***

La abeja *A. mellifera*, como todo un organismo vivo, es susceptible a la acción de diversos agentes etiológicos y depredadores, que causan el deterioro de su salud, por consecuencia ocasionan importantes mermas productivas. Una abeja sola, como individuo aislado, no puede vivir. Es la colmena la unidad básica y se considera enferma, cuando determinada cantidad de los individuos que la forman lo están (Verde y Bande, 2017).

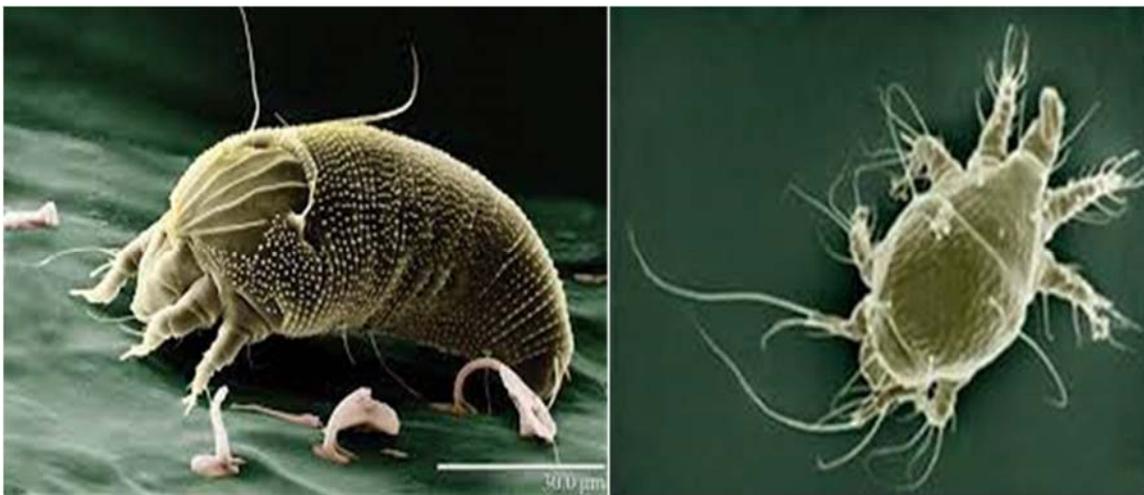
Según expone Pérez-Morfi (2020) la salud de las colmenas no se define solamente por la ausencia de enfermedades, sino también por la existencia de colonias bien nutridas, capaces de reproducirse y resistir exitosamente los desafíos de los agentes etiológicos de diversa naturaleza.

En Cuba, cuando se producen grandes infestaciones en las colmenas, no se aplican medicamentos, antibióticos ni sustancias químicas para su tratamiento, porque pueden tener efectos perjudiciales para la salud de las abejas, en particular si hospedan patógenos. Ante estas circunstancias solo se practica el Manejo

Integrado, que consiste en el saneamiento de las colmenas y la castra en el apiario, para evitar el transporte de miel o panales infectados (Pérez, 2017).

Las enfermedades de las abejas están inscritas en la lista del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). En la misma figuran seis enfermedades principales: la *Acarapisosis*; la Loque americana; la Loque europea; la infestación por *Aethina tumida*; *Tropilaelaps* y la Varroosis. Siendo la infestación por *Varroa destructor* la más destacada y dañina en el mundo entero. En Cuba La varroosis y la acarapisosis son enfermedades parasitarias de gran significación para el sector apícola (Pérez, 2017).

Dentro de las enfermedades más recurrentes se encuentra la Acarapisosis; enfermedad invasiva contagiosa que afecta a las abejas adultas. La misma consiste en una parasitosis interna causada por el ácaro microscópico, *Acarapis woodi* (figura 3), denominado también ácaro traqueal. Es un parásito que desarrolla su acción patógena a través de la obstrucción mecánica de las vías respiratorias. Según informan Figueroa y Arechavaleta-Velasco (2018), la tráquea parasitada se obstruye a causa del acúmulo de los propios ácaros, además de los detritos formados por sus excrementos. La hemolinfa de la abeja se extravasa y deshidrata, lo cual conduce finalmente a la oclusión y deterioro de la tráquea.



**Figura 3:** Ácaro microscópico, *Acarapis woodi* (Tomado de Fundación Amigos de las Abejas, 2021).

Informan Shakib y Mehdi (2016), que el ácaro traqueal (*A. woodi*) se ha registrado en Asia, Europa, partes de África, América del Norte y del Sur excepto, Australia, Nueva Zelanda, Noruega y Suecia. En América Latina Maggi *et al.* (2016) identificaron su presencia, al revisar el estado de salud de las abejas en diferentes países y reportaron frecuencias de 1 a 2.7 % en Uruguay y 2.7 % en el estado de Táchira en Venezuela. Por otra parte, los estudios realizados por Martínez *et al.* (2022), para determinar la frecuencia y niveles de infestación de *A. woodi*, informan que no se observó la presencia del ácaro, en el estado de Tabasco, México.

En Cuba, se diagnosticó su presencia (*A. woodi*) a partir de 1990, en la zona oriental del país. Años más tarde el Laboratorio de Referencia para Investigación y Salud Apícola (LARISA) realizó un estudio que comprendió un período de nueve años (2005-2013), para diagnosticar la presencia de *Acarapis woodi* en apiarios de la Provincia Sancti Spíritus. Los resultados de dicha investigación informan, que la presencia del parásito es bastante vigente en los apiarios de esa región a pesar de no evidenciar síntomas de la enfermedad. Alegó, además, que es frecuente un cierto periodo de latencia de la enfermedad; pues la tasa de multiplicación del ácaro en las colonias de abejas es baja. Esto se debe a que en verano mueren muchas abejas infestadas, y por ello, la presión parasitaria disminuye. En invierno, cuando las abejas viven más tiempo, los ácaros pueden ejercer mejor su acción patógena (Fernández *et al.*, 2016).

Las lesiones provocadas por la presencia del ácaro (*A. woodi*) desarrollan un cuadro clínico en la abeja y en la colonia, que imposibilita el vuelo del insecto por no recibir la musculatura alar todo el oxígeno necesario. Una de las primeras manifestaciones del proceso es la presencia frente a la colmena, de abejas que corren o se arrastran sin rumbo, incapaces de volar más allá de cortas distancias o como si se movieran a saltos (de la Torre, 2022).

Una de las enfermedades más grave de las abejas melíferas y presente en todo el mundo es la Loque americana (AFB (American foulbrood), por sus siglas en inglés); también conocida como enfermedad de la cría sellada. Es una enfermedad bacteriana de la prole o cría de abejas, altamente contagiosa, que resulta de la

infección de larvas de abejas melíferas con *Paenibacillus larvae*; bacteria grampositiva productora de esporas (Ebeling *et al.*, 2021).

Según expone la literatura científica, la bacteria patógena mata las larvas en las celdillas de cría. A pesar de que sólo infecta a las larvas, la AFB debilita a la colonia y puede conducir a su muerte en tan sólo tres semanas. En las colmenas infectadas, la colonia presenta un aspecto irregular o salteado debido a las celdillas vacías (figura 4), a veces con un olor característico (fétido) y la cría tiene una apariencia viscosa o húmeda (López y Underwood, 2023).



**Figura 4:** Panales infectados por la bacteria *Paenibacillus larvae*. Opérculos perforados (Tomado de López y Underwood, 2023).

*Paenibacillus larvae* ha causado enormes daños a la industria apícola. Se transmite comúnmente a través de esporas de la bacteria que pueden estar latentes, en las colonias o equipos utilizados, por 70 años o más. La alimentación de larvas por las abejas nodrizas con alimentos contaminados con esporas de la loque americana hace que estas esporas pasen a una etapa vegetativa que se replica en el tejido larvario y conduce a su muerte (López y Underwood, 2023).

Otra de las enfermedades que ataca a las abejas es La Loque europea (European foulbrood (EFB), por sus siglas en inglés); también conocida como Loque Benigna, es una enfermedad bacteriana que afecta a la cría de abejas. Su agente etiológico es la bacteria Gram-positiva no esporulante *Melissococcus plutonius*. La infección

de la larva se realiza vía oral, por alimento contaminado. En la figura 5 se muestra como las larvas infectadas pierden el color nacarado de las sanas, se vuelven opacas, amorfas (aunque algunas no pierden el anillado), blanquinosas o marfileñas, frecuentemente con el extremo de la cabeza de color más oscuro, o negro (Forsgren *et al.* 2013).

Afirman Moharrami *et al.* (2022) que La loque americana (AFB) y la loque europea (EFB) son las dos enfermedades más importantes de las crías de abejas melíferas a nivel mundial. Ambas imponen grandes pérdidas económicas a la industria apícola, al reducir la población de abejas y la producción de miel. A pesar que EFB ocasiona menos daño que los generados por AFB, el tratamiento con antibióticos ha provocado la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, lo que exige procedimientos alternativos seguros que puedan controlar estas enfermedades.



**Figura 5:** Infección por Loque europea (Tomado de Manual de enfermedades Apícolas. 2009).

Las colmenas de abejas también pueden verse amenazadas por depredadores que causan el deterioro de su salud y daños considerables en los apiarios. Según reportes de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2020), *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) también conocido como el Pequeño Escarabajo de la Colmena (PEC), es nativo del África subsahariana, donde generalmente se considera una plaga menor. En las últimas dos décadas, ha colonizado colmenas en países de: América, Australia, Europa y Asia, convirtiéndose en un problema importante para la apicultura.

Arguedas *et al.* (2020) informan que *A. tumida* es una especie invasora que puede reproducirse en hospederos alternos como colonias de abejas nativas sin aguijón (meliponinos), abejorros (*Bombus* sp.), así como en una gran variedad de frutas y en carnes. Sin embargo, su principal hospedero es la colonia de abejas melíferas. En las colmenas los daños son provocados tanto por los escarabajos adultos como sus larvas y ambos estadios se alimentan de miel y polen. No obstante, las larvas causan el mayor daño en la colonia, pues se alimentan de la cría de las abejas; forman galerías en los panales y ocasionan la fermentación de la miel, debido a la levadura *Kodamea ohmeri*, presente en sus deyecciones. El primer signo de infestación, en las colonias, es la presencia de escarabajos adultos y en infestaciones severas, se observan larvas y miel fermentada. Plantean Lóriga *et al.* (2014) que este parásito oportunista de las colmenas (*A. tumida*) se reportó en Cuba, en el año 2012, en colonias de *Apis mellifera* L. sin que haya provocado perjuicios apreciables.

La *Varroa destructor* y *Tropilaelap* spp., son ácaros que también parasitan a las colmenas de abejas. Ambos producen una parasitosis externa grave que, si no es tratada, causa serios perjuicios a las colonias. El ciclo biológico de ambos ácaros es similar, desarrollándose la mayor parte en el interior de la celda operculada. Una o varias hembras grávidas eligen una celdilla que contenga una larva finalizando su etapa abierta y se introduce en ella momentos previos a la operculación. Se reproducen tanto en celdillas de zángano como de obrera, con una ligera preferencia por la cría del zángano, que puede ser casi un 100% parasitada (OIE, 2020).

Según reportes de Khongphinitbunjong *et al.* (2019), *Tropilaelap* spp. es endémico de Asia y tiene potencial de convertirse en una amenaza global para las abejas tanto silvestres como manejadas. Su probable introducción en nuevas zonas dependerá de la transmisión entre colonias, fundamentalmente por el movimiento de los ácaros hembra sobre las abejas adultas durante el periodo forético, el pillaje, la deriva, las transacciones comerciales, la enjambrazón natural, las manipulaciones descuidadas del apicultor y la trashumancia no controlada de las colmenas.

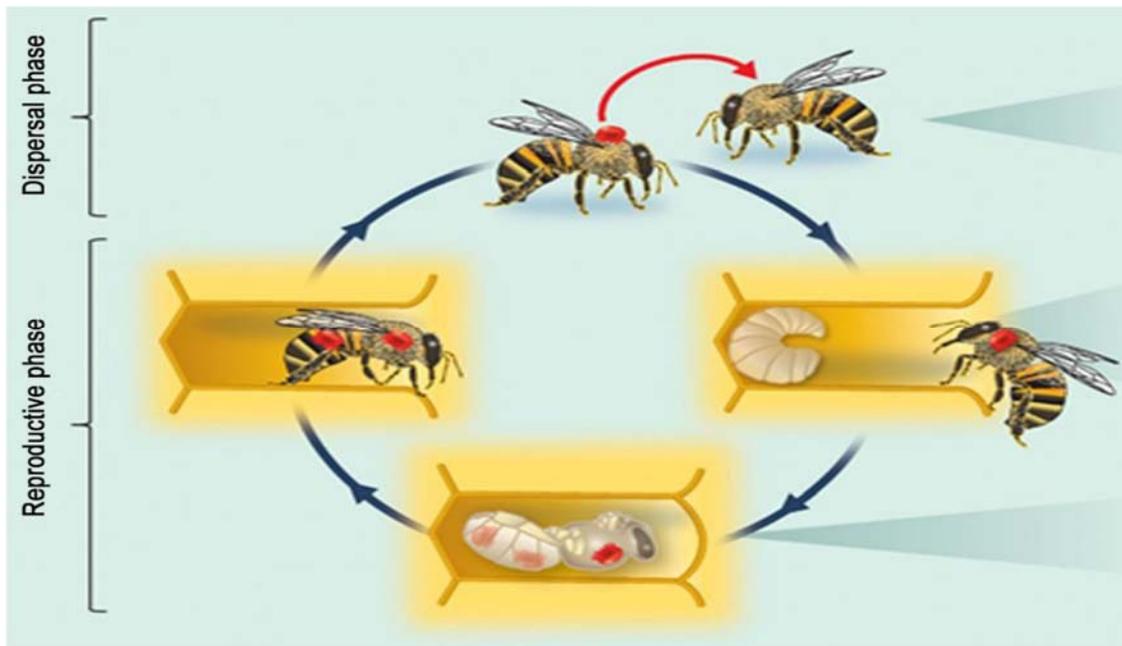
Los estudios realizados demuestran que *Tropilaelap* spp. no sobrevive más de 48 h sin alimentarse de las abejas. Su supervivencia no sólo depende del alimento que obtienen de ellas, sino también de la temperatura y la humedad relativa del ambiente (Khongphinitbunjong *et al.* 2019). De acuerdo a la literatura científica consultada la tropilaelapsosis no está diagnosticada de forma oficial en Cuba, lo que obliga a incrementar las medidas de control para evitar su entrada en relación a tantos movimientos intracomunitarios como con terceros países.

Sin embargo, el ácaro *Varroa* es considerado el agente etiológico más importante de los colmenares, por su amplia distribución mundial y el daño que ocasiona al sector apícola. La varroosis se ha transformado en el principal obstáculo para el desarrollo de la apicultura. Año tras año, cientos de colmenas mueren como consecuencia de esta parasitosis. Además, se reduce drásticamente la producción de miel y los demás productos de las colonias, lo que provoca el deterioro y colapso a mediano plazo (Masaquiza *et al.* 2019).

Se han descrito cuatro especies ectoparásitas: *Varroa jacobsoni* Oudemans, *V. underwoodi*, *V. rindereri* y *V. destructor*. Siendo este último (*Varroa destructor*) la plaga más devastadora de la abeja melífera occidental, *Apis mellifera* Linneus (Hymenoptera: Apidae). *V. destructor* carece de una etapa de vida libre e independiente de las abejas. El ciclo de vida del ácaro está estrechamente ajustado, altamente dependiente del de la abeja y presenta aspectos morfológicos que demuestran su alta adaptación al parasitismo: su forma esférica aplanada; la situación de las extremidades en la mitad anterior para una mejor sujeción en su hospedador; la maduración de los espermatozoides que ocurre en las espermatecas del aparato reproductor femenino (reina); los órganos sensoriales, que algunos extractos químicos de la cutícula de las larvas y de su alimento, estimulan la ovoposición y atracción de los ácaros (OIE, 2021).

En cambio, el ciclo de vida de los ácaros hembra consta de dos fases distintas (figura 6): la fase de dispersión, en la que *V. destructor* parasita a las abejas adultas, aprovechando la oportunidad para usarlas como vehículo de transporte dentro de la colonia o entre colonias, y la fase reproductiva, en la cual los ácaros parasitan las

larvas de zánganos u obreras justo antes de la operculación y se reproducen dentro de las celdas operculadas de zánganos y obreras. Los ácaros machos tienen una vida corta y solo se pueden encontrar durante la fase reproductiva dentro de las celdas de cría operculadas (OIE, 2021).



**Figura 6:** Ciclo de vida de *V. destructor*: fase dispersión y reproducción (Tomado de OIE, 2021).

El ácaro (*V. destructor*) daña el tegumento de la abeja, debilitándola física y fisiológicamente, al deprimir su sistema inmune y favorecer la susceptibilidad a desarrollar enfermedades bacterianas, fúngicas o virales. Se ha demostrado que *V. destructor* puede actuar como vector del virus del ala deformada (DWV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV), el virus de la abeja de Cachemira (KBV) y el virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) entre otros (OIE, 2021).

En Cuba se diagnosticó la presencia de *Varroa destructor* en 1996 y transformó la apicultura cubana; 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. La enfermedad parasitaria indujo cambios significativos en el manejo de las colmenas y en consecuencia para la apicultura cubana. *V. destructor*, debilita la, al deprimir su sistema inmune y favorecer la infección por otros patógenos, es letal si no se trata adecuadamente (Pérez, 2017).

### **I.8. Probióticos. Su empleo en la apicultura**

Desde hace algunos años, a nivel mundial se ha dado a conocer la necesidad de sustituir los antibióticos promotores del crecimiento (APC) utilizados como aditivos alimentarios en la producción animal, por otros aditivos alternativos que sean compatibles con el medio ambiente y que eviten efectos negativos en la salud humana, tales como los probióticos. Estas se usan para mejorar la salud del tracto gastrointestinal y sólo son efectivas cuando sus necesidades nutricionales para el crecimiento son cubiertas (Florencia *et al.*, 2018).

Se denomina probiótico a un monocultivo o un cultivo mixto de microorganismos vivos, cuya administración ejerce algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido (de Melo, 2018). En las últimas décadas se constata que los probióticos y los extractos de plantas son los más utilizados para mejorar los indicadores productivos y de salud. Su empleo es una práctica ampliamente utilizada, tanto en humanos, como en animales (Milián *et al.*, 2023).

Los microorganismos que colonizan plantas y animales son parte constitutiva, funcional y no prescindible del organismo anfitrión. Una microbiota desequilibrada puede ser causa de enfermedad, afectar el desarrollo corporal, alterar la regulación del sistema inmunitario y del metabolismo, e incluso, influir negativamente en la conducta (Milián *et al.*, 2021).

Los aditivos probióticos se suministran con el propósito de ser utilizados como promotores del crecimiento animal, pues mejoran la composición del microbioma intestinal y la eficiencia en el uso de los alimentos, estimulan el sistema inmune e inhiben a microorganismos patógenos sin la utilización de antibióticos. En el ámbito internacional se trabaja en la incorporación a la producción animal de aditivos zootécnicos que posean actividad probiótica (Milián *et al.*, 2021).

Existen innumerables referencias actualmente dedicadas a la selección y caracterización de nuevas especies y cepas más específicas de bacterias probióticas. Los estudios adoptan los criterios de selección básicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluida la capacidad de adhesión al epitelio y la actividad antimicrobiana. Estos aspectos se aplican para garantizar que el probiótico candidato pueda soportar las condiciones estresantes del sistema digestivo y ejercer propiedades funcionales (de Melo, 2018).

Según Antúnez, (2012), los probióticos pueden disminuir la tasa de mortalidad a causa de severas infecciones en las abejas. El autor señaló, que los principales criterios de selección de las cepas probióticas para abejas son: resistir altas concentraciones de azúcares, tener 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, mejorar la salud y la producción de miel y ser inocuo para las larvas o abejas adultas y no provocar toxicidad.

Aunque los probióticos pueden ser beneficiosos para la salud de las abejas, es importante realizar pruebas para asegurarse de que no tienen efectos colaterales negativos. En este sentido, especialistas del grupo de aditivos nutricionales del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas, cuentan con la experiencia necesaria para la obtención de biopreparados probióticos y su aplicación en animales de interés zootécnico.

Desde hace cuatro años la UM trabaja de conjunto con la UEB Apícola Matanzas, en un proyecto CITMA Territorial cuya tarea principal está dirigida a obtener un biopreparado probiótico, a partir de cepas de lactobacilos aisladas del tracto gastrointestinal (TGI) de abejas *Melipona beecheii* y su miel. En la presente tesis se evalúa la toxicidad de este biopreparado con potencial probiótico para su aplicación inocua y segura en las poblaciones de abejas *Apis mellifera*. Actualmente el CEBIO, investiga en la selección e identificación de otras cepas con potencial probiótico (*Bacillus* spp. y levaduras) y evalúa la actividad antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* ante microorganismos patógenos.

### **I.8.1. Empleo de *Bacillus* spp y *Lactobacillus* spp. en la apicultura**

Numerosas investigaciones indican que las especies de *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. son las más utilizadas como candidatos con potencial probiótico, ya que poseen el requisito principal de sobrevivir a la extrema acidez del estómago, tolerar las sales biliares y otras condiciones hostiles del TGI, además, de tener buena adherencia y propiedades bioterapéuticas (Florencia *et al.*, 2018).

Según Alippi y López (2018) el tratamiento con antibióticos ha provocado la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, lo que exige tratamientos alternativos seguros que puedan controlar las enfermedades. *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. tienen aplicaciones potenciales en la apicultura y la producción de miel, juegan un papel importante en la salud general de las abejas y la prevención de enfermedades, el fortalecimiento de su sistema inmunológico y la mejora de la calidad de la miel y otros productos apícolas.

Florencia *et al.* (2018), demostraron el potencial probiótico que tienen las cepas de *Bacillus* 4A, 230P y 86B aislados de mieles y polen proveniente de abejas nativas sin aguijón. Las mismas mostraron un marcado efecto probiótico en el control de patógenos como: *Listeria innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aureuginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Estudios realizados por Ruíz *et al.* (2021), demuestran el efecto antifúngico de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a los hongos *Aspergillus nigri* y *Penicillium serie crhysogenum* aislados de las cutículas de hormigas establecidas en colmenas de *Apis mellifera* L.

Investigaciones realizadas por Audisio (2017), informan que los recuentos de esporas de *Nosema* spp. y *Varroa* spp. en las colmenas tratadas, con la cepa *B. subtilis* subsp, fueron más bajos que en las del grupo control. Estos resultados indican que la cepa probiótica (*B. subtilis* subsp) favoreció la productividad de las abejas. En primer lugar, porque el microorganismo estimuló la puesta de huevos de la reina, lo que se tradujo en un mayor número de abejas y, en consecuencia, más producción de miel. En segundo lugar, porque redujo la prevalencia de dos

enfermedades importantes de las abejas en todo el mundo: la nosemosis y la varroosis.

En un ensayo a nivel de laboratorio Hernández *et al.* (2021), utilizaron especies de *Bacillus* ssp. y *Brevibacillus* ssp., asociadas con abejas melíferas, como alternativa natural para el control de AFB y cría yesificada. En los resultados se observó la inhibición de los patógenos, causantes de dichas enfermedades, ante la presencia de las cepas probióticas. Este experimento constituye el primer estudio de asociaciones entre la presencia de genes relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos y su antagonismo ante *P. larvae* y *A. apis*.

Por otra parte, Audisio *et al.* 2018) afirman que los lactobacilos también se han estudiado como una posible forma de controlar a la bacteria *Paenibacillus larvae*. Algunos estudios demuestran que ciertas cepas de lactobacilos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de esta bacteria, lo que sugiere que podrían ser utilizados como agentes probióticos para prevenir esta enfermedad en las colonias de abejas.

Truong *et al.* (2023), identificaron 20 cepas del género *Lactobacillus* con propiedades antimicrobianas contra *P. larvae*. Los autores 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 probióticos para la prevención de BAAR. Es importante destacar que la especie *L. panisapium* aislada de larvas se identificó por primera vez con actividad antimicrobiana en este estudio. *Paenibacillus larvae* es peligrosa y amenaza la apicultura. Se espera que el método de tratamiento ecológico que utiliza probióticos sea el método prospectivo para controlar este patógeno en las abejas melíferas.

La aplicación de bacilos y lactobacilos en la apicultura tiene el potencial de mejorar la salud y la productividad de las colonias de abejas. Estos microorganismos beneficiosos pudieran ser utilizados como suplementos alimenticios en los jarabes o como agentes probióticos para promover el bienestar de las abejas y la sostenibilidad de la apicultura.

## 1.9. Estudios toxicológicos en abejas *Apis mellifera*

Las abejas como agentes polinizadores garantizan las condiciones de biodiversidad, generan impactos positivos sobre las producciones agrícolas que permiten mejores rendimientos. Sin embargo, constantemente se encuentran expuestas a la presencia de sustancias tóxicas, fundamentalmente agroquímicos empleados para desarrollar la agricultura. La presencia de sustancias tóxicas en el medio ambiente, puede ser un factor perjudicial para la salud de las colonias de abejas. Los agroquímicos son de particular interés a causa de los posibles efectos subletales en abejas individuales y en la colonia, lo cual produce posiblemente su pérdida e incluso, la de apiarios completos (Noel *et al.*, 2020).

Según describe Rodríguez (2019), la evaluación del riesgo potencial que representa para los insectos polinizadores el uso de productos agroquímicos, está compuesta por el estudio de: a) la toxicidad oral aguda; b) la toxicidad de contacto. Donde a) y b) se expresan como Dosis Letal Media (DL50) oral y de contacto y se definen como: “la dosis letal que mata al 50% de la población en estudio, por vía sistémica o de contacto”, c) índice de exposición a la toxicidad y d) resultados de semi pruebas de campo (p. ej., mortalidad de abejas directa o diferida), que destacan el impacto en el desarrollo de la cría y las habilidades de alimentación.

Los datos de los cálculos de DL50 oral se pueden utilizar para generar el Coeficiente de Riesgo (CR) para cada compuesto de interés. Dicho cálculo (DL50) proporciona un valor bruto solamente. Este resultado tiene que estar relacionado con la exposición de las abejas melíferas en condiciones de campo. Se define CR como la relación entre la exposición potencial a una sustancia y el nivel en el que no se esperan efectos adversos, es decir, cuanto mayor sea el nivel sin efecto tóxico observable menor peligrosidad presentará el producto (Rodríguez 2019).

Cuando el  $CR < 50$ , el producto puede considerarse de bajo riesgo agudo para las abejas melíferas. El CR no predice la toxicidad del producto para la cría ni la ocurrencia de ningún efecto subletal en adultos o crías. Cuando el  $CR > 50$ , se

requieren más pruebas en condiciones de campo o semicampo para una mejor evaluación del impacto (Rodríguez, 2019).

En casi toda Latinoamérica y el Caribe los agroquímicos siguen siendo de libre uso en la agricultura, sin ninguna prevención ni restricción. Sin embargo, causan severos daños a las poblaciones de abejas y otros insectos. La Oficina de Prevención, Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (OPPTS) de los Estados Unidos, elaboró una serie de guías de pruebas que se desarrollan para evaluar el uso de pesticidas y sustancias tóxicas. Esta guía está destinada a cumplir con las pruebas de requisitos de insecticidas, fungicidas y rodenticidas antes de su exposición al medio ambiente (Rodríguez, 2019).

Carrasco-Letelier *et al.*, (2012) evaluaron la toxicidad aguda por contacto del ácido oxálico (OA) en una subespecie polihíbrida de abeja (*Apis mellifera*) y determinaron la dosis letal media (DL50), así como el nivel sin efecto observado y el nivel más bajo. La dosis que se determinó según la evaluación realizada fue de 3,1 g de OA por colmena. Los resultados también resaltan algunas diferencias entre el valor DL50 en las abejas SWZU (548,95 µg OA por abeja) y algunos valores DL50 publicados para otras subespecies de abejas.

En Cuba, desde hace varios años se lleva a cabo un Plan de Monitoreo y Vigilancia de Residuos Químicos en la Miel de Abeja. El mismo mostró que el 2019 resultó ser el más afectado y la provincia de Matanzas la más contaminada (16,7%) con residuos químicos. Estos incluyen acaricidas, ácidos orgánicos, insecticidas, fungicidas, herbicidas, y bactericidas. El uso desmedido de estos productos conlleva un riesgo para la salud de las abejas y la contaminación directa de la miel y otros productos de la colmena (Bello *et al.*, 2022).

Los estudios toxicológicos en *Apis mellifera*, se realizan para conocer los efectos nocivos que causan las sustancias que se exponen al medio ambiente o aquellas empleadas para controlar plagas o erradicar enfermedades. La literatura científica actual propone alternativas naturales e inocuas que no dejen residuos químicos en las colmenas ni en sus productos derivados (Moharrami *et al.*, 2022).

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Elaborar en condiciones de laboratorio el biopreparado con potencial probiótico a partir de la cepa de *Lactobacillus* L 31 aislada del tracto digestivo de *Melipona beecheii*.

El biopreparado con potencial probiótico se elaboró en el laboratorio de microbiología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas (UM). En la tabla 2 se muestra la composición del medio para elaborar un litro del preparado microbiano.

**Tabla 2:** Composición del medio para elaborar el biopreparado probiótico.

Composición	g.L <sup>-1</sup>
Miel final de caña (36 % azúcares reductores totales)	63,0
HELSc (8,8 % nitrógeno total)	41,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,02

Una vez preparado el medio (tabla 2) se ajustó el pH a 6,5 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración de 1 mol.L<sup>-1</sup> se esterilizó en autoclave (LDZM-80KCS) a 121°C por 15 min y posteriormente se inoculó el microorganismo con potencial probiótico (*Lactobacillus* L 31).

**Microorganismos e inoculación:** El microorganismo inoculado pertenece al banco de cepas del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO), de la UM. El mismo (*Lactobacillus* L31) fue aislado del tracto digestivo de abejas *Melipona beecheii* sanas. La cepa *Lactobacillus* L 31 (inóculo), se cultivó en caldo MRS (BioCen) por 18 h a 37 °C (incubadora, Boxun) en condiciones estáticas y posteriormente se realizó la inoculación al medio (tabla 2) de 112 mL.L<sup>-1</sup> con una concentración de 10<sup>6</sup> ufc.mL<sup>-1</sup>. A partir de la inoculación se desarrolla el crecimiento de la cepa por 24 h a 37 °C (incubadora, Boxun) en condiciones estática. El biopreparado elaborado se conservó en condiciones refrigeradas a una temperatura entre 4 y 8 °C hasta su utilización. Para determinar su calidad se realizaron los conteos de viables y la determinación del pH.

**Conteo de viables:** Para efectuar el conteo de *Lactobacillus* L 31 se realizaron diluciones seriadas de la muestra en una relación de inoculación de 1:10 (v/v) en agua de peptona (1% de peptona bacteriológica) (OXOID), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ . Las tres últimas diluciones se sembraron individualmente (1 mL) a profundidad en placas con doble capa de agar MRS (BioCen). 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.

**Determinación de pH:** para determinar el pH se realizaron tres repeticiones. Estas fueron obtenidas de dos mediciones, las cuales fueron promediadas. La medición de los valores de pH se realizó en un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

## **2.2 Evaluar “*in vivo*” la toxicidad del biopreparado probiótico sobre poblaciones de abejas melíferas en condiciones controladas.**

La evaluación “*in vivo*” de la toxicidad del biopreparado probiótico sobre las poblaciones de abejas melíferas, bajo condiciones controladas, se realizó en el laboratorio de Microbiología de la UM, durante diez días en el mes de noviembre del año 2023. Para llevar a cabo esta evaluación se siguió el protocolo descrito por el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA).

### **Condiciones experimentales y tratamientos**

Las abejas utilizadas en el experimento procedían de un Centro de Crías de Abejas Reinas, epizootiológicamente evaluado como saludable, perteneciente a la UEB Apícola Matanzas, ubicada en el municipio de Jovellanos. Las abejas y sus reinas se seleccionaron de diez núcleos de fecundación con iguales condiciones de tenencia y fortaleza, para mantener la mayor homogeneidad en la población de abejas. Las abejas se alojaron en cajas de madera y cristal diseñadas por especialistas de la propia empresa. Estas cajas se conformaron con las siguientes dimensiones: 41cm de largo, 9 cm de ancho y 29 cm de altura.

En cada caja se introdujo un panal de crías con su reina; las abejas fueron previamente inmovilizadas por congelación durante 10 min, para agregarlas a razón de 450 y 460 individuos por caja (figura 7). Una vez colocadas las abejas dentro de

las cajas fueron transportadas hasta la UM. El traslado de las cajas con las abejas se realizó en un transporte cerrado y en horas tempranas de la mañana. Al llegar al laboratorio se dejaron reposar 24 horas, se enumeraron las cajas de manera consecutiva para su posterior identificación en el ensayo *in vivo*.



**Figura 7:** Distribución de las abejas por tratamientos y alimentación.

Las cajas se mantuvieron estáticas en meseta, en un área oscura protegidas de la luz directa, a temperatura ambiente (25 – 30 °C, entre 50-60 HR). Durante los días que duró el ensayo, se preparó el jarabe diariamente de cada uno de los tratamientos y se reemplazó por uno nuevo de similares características, quedando siempre el consumo de las abejas *ad libitum*.

**Preparación del jarabe.** El jarabe (hidromiel) que se utilizó como alimentación artificial se formuló en una proporción de 1:1 v/v (miel / agua destilada). La hidromiel se utilizó como dieta para alimentar a las abejas e introducir el biopreparado y las variantes que conformar los tratamientos. Las abejas se alimentaron a través de orificios en las tapas de frascos plásticos invertidos (figura 7). Pasado los diez días de experimento se mantuvo el alimento porque numerosas abejas sobrevivieron.

Se elaboró un litro del biopreparado probiótico (acápite 2.1) y se centrifugó (T23-Janetzki) a 5000 rpm durante cinco minutos, para obtener las células de *Lactobacillus* L31 y las sustancias posbióticas (sobrenadante). Posteriormente las células del microorganismo probiótico (*Lactobacillus* L31) se lavaron dos veces con buffer salino fosfatado estéril (PBS) (ver composición tabla 3) y luego se resuspendieron en este mismo buffer.

**Tabla 3:** Composición del PBS 1X.

Reactivos	Cantidad
Cloruro de sodio	8.06 g
Cloruro de Potasio	0.22 g
Hidrogeno fosfato de sodio (Na <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> )	1.15 g
Hidrogeno fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.20 g
Agua destilada	1000 mL
pH 7.4	

**Tratamientos establecidos:** El biopreparado y sus variantes (células de *Lactobacillus* L31 y las sustancias posbióticas) se inocularon en la hidromiel en una proporción de 1:50 (v/v) (variante del biopreparado / hidromiel). A partir de estas variantes se establecieron los tratamientos que se describen a continuación:

Tratamiento 1: Grupo control: Hidromiel

Tratamiento 2: Grupo hidromiel + biopreparado

Tratamiento 3: Grupo hidromiel + células de *Lactobacillus* L31

Tratamiento 4: Grupo hidromiel + sustancias posbióticas producidas por *Lactobacillus* L31.

**Diseño experimental.** Las cajas para la administración del jarabe con los tratamientos se conformaron según se refleja en la tabla 4. De las diez cajas se seleccionaron ocho (dos cajas por tratamiento) para el ensayo *in vivo*.

**Tabla 4:** Conformación de los grupos para el ensayo *in vivo*.

Tratamiento recibido	Caja N.º
Abejas que recibieron el tratamiento 1 (control)	Caja 1 y 2
Abejas que recibieron el tratamiento 2	Caja 3 y 5
Abejas que recibieron el tratamiento 3	Caja 6 y 8
Abejas que recibieron el tratamiento 4	Caja 9 y 10

## **Variables monitoreadas para evaluar la toxicidad del biopreparado probiótico**

**Mortalidad:** Esta variable se monitoreó diariamente durante los días que duró la investigación. Al final del ensayo a partir de las abejas muertas y las sobrevivientes se logró determinar la totalidad de las abejas y la tasa de mortalidad diaria y en el período (número de muertas/total de abejas).

**Consumo de Jarabe:** El consumo se observó cada 24 h. La cantidad de jarabe añadido durante los diez días del experimento fue anotada para evaluar el consumo total y compararlo entre los grupos.

**Sintomatología de enfermedad/signos de enfermedad.** Se chequeó diariamente mediante el método de la observación visual del insecto, así como la deposición de las heces durante su movimiento por el fondo y el derramamiento de estas en el cristal frontal de las cajas. Se dejó constancia de la sintomatología observada en cada grupo de abejas, resaltando los que mostraban dificultad locomotora, alas dobladas y distensión del abdomen por el acumulo de heces en ellos.

**Estado sanitario.** Para evaluar el estatus sanitario de la población de abejas se realizó un control diagnóstico al final del experimento (10 d), midiéndose los niveles de infestación de las principales enfermedades declaradas por el sistema de vigilancia Estatal de Sanidad Animal; se siguieron los protocolos descritos en las normas cubanas de Varroosis (NC-960, 2018) y Acarapisosis (NC-961, 2018).

**Conteos de *Lactobacillus* spp.:** Se realizó en tres momentos (3, 6 y 10 días). Para ello se hicieron aislamientos del tracto digestivo de abejas muertas de los tratamientos 1 control (hidromiel) y tratamiento 2 (biopreparado). La técnica se efectuó de acuerdo a lo descrito anteriormente en el acápite 2.1 (conteo de viables).

**Análisis estadístico.** Los datos de mortalidad y consumo del jarabe, fueron tabulados y analizados según el software estadístico STATGRAPHICS Plus versión 5.0 (inglés) (Statgraphics, 2002). Se comprobó que los datos cumplían con la normalidad, por lo que se aplicó un ANOVA simple para comprobar diferencias entre tratamientos y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan (1955) al 95 % de probabilidad de confianza. Los conteos de microorganismos viables se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de la normalidad en la

curva de crecimiento. Para su análisis, se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^X$ , donde K es la constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo; N es el número de UFC; 10 es la base de los logaritmos y X es la dilución a la cual se efectuó la inoculación.

### **2.3 Valorar el potencial económico, social y ambiental del biopreparado probiótico a nivel de producción.**

Se realizó una valoración integral donde se tuvieron en cuenta aspectos económicos, sociales y ambientales, para estimar los beneficios que aporta la aplicación del biopreparado probiótico en las poblaciones de abejas. Para ello, se procedió a la búsqueda de la información necesaria de cada uno de los elementos o componentes que intervienen en la crianza y manejo de estos insectos, además, se tuvo en cuenta la relación social y ambiental en que se desarrollan los mismos.

Otros aspectos a considerar fueron los recursos económicos e insumos materiales que se utilizan para suplementar la alimentación de las abejas en determinadas épocas del año o en condiciones adversas del clima. Los datos, según los precios establecidos, fueron aportados por el departamento económico de la UEB Apícola Matanzas.

### CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Elaborar en condiciones de laboratorio el biopreparado con potencial probiótico a partir de la cepa de *Lactobacillus* L 31 aislada del tracto digestivo de *Melipona beecheii*.

Se elaboró, en condiciones de laboratorio, un litro de biopreparado a partir de la cepa de *Lactobacillus* L 31. Esta bacteria fue aislada del tracto digestivo de abejas meliponas y seleccionada por su potencial probiótico. Señalan Truong *et al.*, (2023) que el género *Lactobacillus* forma parte de la población microbiana principal del TGI de las abejas y constituyen sin dudas, los microorganismos que más se utilizan como probióticos.

La obtención de biopreparados probióticos, a partir del aislamiento y selección de microorganismos benéficos procedentes del tracto digestivo de los animales, es el punto de partida para su aplicación en la producción animal (Rondón *et al.*, 2020). En este sentido, Truong *et al.*, (2023) aislaron de abejas sanas, diferentes cepas de lactobacilos y seleccionaron (*L. apis* HSY8\_B25, *L. panisapium* PKH2\_L3 y *L. melliventris* HSY3\_B5) las que tenían el potencial para ser candidatos a probióticos con propiedades de seguridad para las larvas, inhibición contra *P. larvae* en larvas infectadas y alta capacidad de adhesión.

El biopreparado elaborado en la presente investigación se realizó en un medio optimizado con materias primas nacionales (miel final de caña y PROBIOLEV®), para favorecer el crecimiento de la cepa *Lactobacillus* L31. Resultado que se corrobora a través de los conteos de viables realizados y la determinación del pH.

Se demostró que el biopreparado elaborado tiene un pH de 4,32 y una población de *Lactobacillus* L31 superior a  $10^{12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Estos valores muestran la calidad de su elaboración. En este sentido Rondón (2009) señaló que una de las problemáticas actuales de la tecnología de obtención de probióticos es precisamente el establecimiento de medios de cultivo que contribuyan al crecimiento de los cultivos en concentraciones celulares suficientes que les permitan llegar al TGI y establecerse en este ecosistema. No se puede hablar de un medio de cultivo único o general para cultivar a los probióticos, sino de utilizar en su formulación materias

primas que sean fácilmente asequibles y garanticen el desarrollo óptimo de los microorganismos.

La elaboración del presente biopreparado se basó en la experiencia y los resultados obtenidos por Rondón (2009), cuando diseñó un nuevo medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* (MCLs), aislado del TGI de pollos. La formulación del mismo se condujo principalmente para la sustitución de las fuentes de carbohidratos y proteínas presentes en el medio MRS (medio convencional) por materias primas de producción nacional. Según la autora, los lactobacilos requieren medios complejos con diversos aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento, carbohidratos fermentables, etc., que estimulan su crecimiento. En este caso, la miel final de caña y PROBIOLEV® (componentes nacionales) aportan las concentraciones óptimas de azúcares reductores totales (ART) y nitrógeno total (NT) para favorecer la población de *Lactobacillus salivarius* ( $1 \times 10^{12}$  ufc.mL<sup>-1</sup>), resultado que se corresponde con el de la presente investigación para *Lactobacillus* L31, aislado de abejas.

Estos resultados indican que la composición óptima de azúcares reductores totales y nitrógeno total, cubrió los requerimientos nutricionales de los lactobacilos (*Lactobacillus salivarius* y L31) que se cultivaron.

Tradicionalmente el control de calidad para los cultivos probióticos en los alimentos se basa únicamente en pruebas que garantizan la población adecuada de bacterias viables en los productos durante toda su vida útil. La viabilidad es un factor importante, pero no el único criterio para garantizar la calidad. Los biopreparados probióticos deben presentar una población microbiana en el orden de  $10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup> o mayor, para ser aplicados a los animales (Antúnez, 2012).

Por otra parte, resulta importante destacar que, en los momentos actuales, la obtención de biopreparados probióticos a partir de componentes de origen nacional, reduce su costo de producción y constituye una opción biotecnológica cubana de interés para la producción animal en Cuba.

**Evaluar “*in vivo*” la toxicidad del biopreparado probiótico sobre poblaciones de abejas melíferas en condiciones controladas.**

El biopreparado probiótico suministrado, en ninguna de sus variantes, mostró signos de intoxicación en las abejas evaluadas. Durante el ensayo *in vivo* no se observó síntomas de enfermedad y el estado sanitario de las colonias fue favorable para los cuatro tratamientos. Sin embargo, se observó que, con la aplicación del aditivo microbiano, se redujo la cantidad de abejas muertas en el periodo evaluado. La tabla 5 muestra los resultados de la mortalidad diaria observada en las abejas, durante los diez días. Se aprecian diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos. Se observó que el grupo control (T1) y el T4 (sustancias posbióticas) muestran las mayores muertes por día.

**Tabla 5:** Número de abejas muertas durante el periodo evaluado.

Tratamientos	Número de muertes (media/día)	EE	P
1 hidromiel (control)	12,2 <sup>a</sup>	0,30	0.001
2 (hidromiel + biopreparado)	10,8 <sup>c</sup>	0,35	
3 (hidromiel + células de L31)	11,3 <sup>b</sup>	0,42	
4 (hidromiel + sustancias posbióticas)	12,3 <sup>a</sup>	0.43	

<sup>a, b, c</sup> Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,05$  (Duncan, 1955). EE. Error estándar.

Por otra parte, los tratamientos T2 y T3; consumo de biopreparado y células de *Lactobacillus* L31, respectivamente, manifiestan menor número de muertes por día y colonias más fuertes con mayor vitalidad. Estos resultados pudieran estar asociados a las bondades que les confiere la cepa probiótica ingerida en la hidromiel.

*Lactobacillus* spp. es capaz de colonizar el tracto digestivo tanto en el hombre como en los animales. Esta bacteria desarrolla diferentes mecanismos que favorecen su resistencia a las condiciones adversas del ecosistema gastrointestinal, además de que poseen la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, lo que le permite

excluir a microorganismos patógenos y estimular el sistema inmune. También produce sustancias antimicrobianas, especialmente ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, y enzimas específicas que podrían contribuir a mejorar la digestibilidad de los componentes de la dieta (Rondón *et al.*, 2020). Por estas razones, son diversas las investigaciones que se realizan con el propósito de evaluar su efecto en la salud de los animales.

En este sentido, Audisio y Benítez-Ahrendts (2011), en colonias de abejas, administraron una vez al mes las células de *Lactobacillus johnsonii* y observaron que a los tres meses aumentaba el área de cría abierta y operculada, el estímulo de la ovipostura de la reina, el número de abejas y el rendimiento en miel. Señaló Audisio (2017) que, 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 cepas de *Lactobacillus* o algunas de *Bacillus*.

Se plantea que una de las especies dominantes en el tracto digestivo de abejas melíferas es *Lactobacillus kunkeei*. El rol ecológico de este microorganismo en el tracto de estos insectos es aún desconocido, pero se observó *in vitro* que es capaz de inhibir a bacterias y levaduras patógenas de las abejas. Adicionalmente se comprobó que la morbilidad de las larvas de abejas infectadas por patógenos disminuía cuando estas se suplementaban con un coctel de *L. kunkeei* y otras bacterias productoras de ácido láctico (Al-Ghamdi *et al.*, 2020).

Investigaciones realizadas por Truong *et al.* (2023), demuestran que diferentes cepas de lactobacilos, aisladas de abejas adultas, crías y panales, colonizaron el microbioma intestinal de estas por lo cual, pueden ser usados como cepas probióticas seguras ya que ejercen efectos beneficiosos para la salud y la vitalidad de estos insectos.

La cepa de *Lactobacillus* L31, que se utilizó para elaborar el biopreparado aplicado en la presente investigación, fue aislada del tracto digestivo de abejas meliponas. A pesar de que, en la literatura científica consultada, prácticamente no existe información acerca de su microbiota, se conoce que son más resistentes a las

enfermedades que *Apis mellifera*. Los resultados del ensayo *in vivo* realizado en la presente investigación muestran, que el suministro de la cepa candidata a probiótico favorece la vitalidad de las abejas que lo consumieron. En la tabla 6 se expone el porcentaje de mortalidad por tratamientos durante los diez días de evaluación del biopreparado. Los tratamientos T1 y T4 resultaron los de mayor tasa de mortalidad y estos difieren ( $P < 0,05$ ) de los tratamientos T2 y T3 donde a pesar de tener menor número de muertes mantienen la fortaleza y vitalidad de la colonia, posterior al periodo experimental.

**Tabla 6: Comportamiento (%) de la mortalidad durante el ensayo *in vivo*.**

Tratamientos	Mortalidad (%)	EE	P
<b>1 hidromiel (control)</b>	26,54 <sup>a</sup>	0,22	0.001
<b>2 (hidromiel + biopreparado)</b>	23,52 <sup>b</sup>	0,21	
<b>3 (hidromiel + células de L31)</b>	24,55 <sup>b</sup>	0,45	
<b>4 (hidromiel + sustancias posbióticas)</b>	27,08 <sup>a</sup>	0,36	

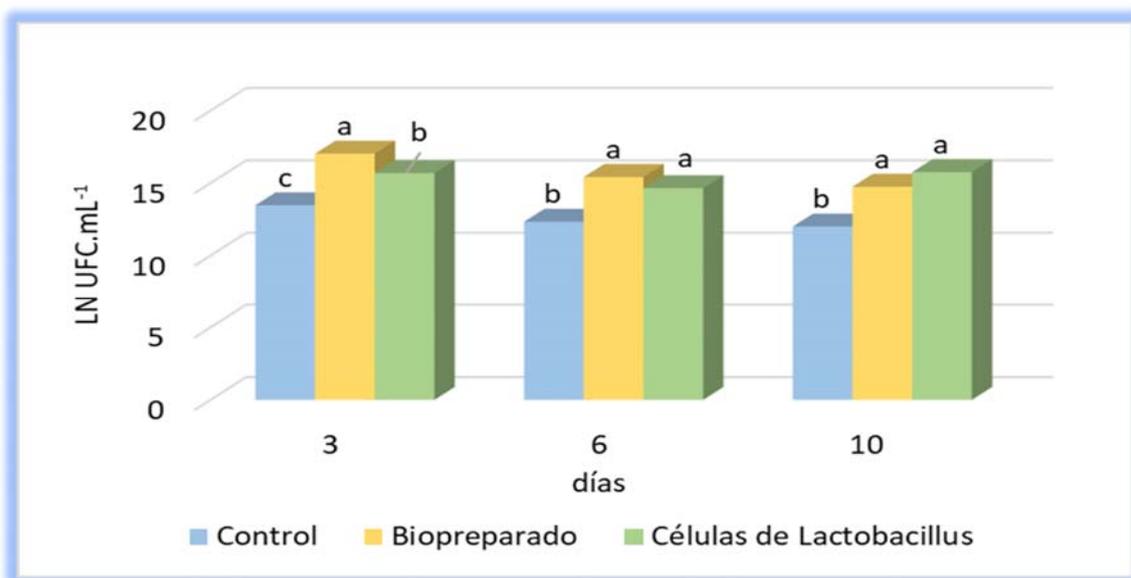
<sup>a, b</sup> Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,05$  (Duncan, 1955). EE. Error estándar.

Estos resultados pudieran estar relacionados con el suministro del alimento artificial, donde en los tratamientos T1 y T4 la dieta se basó en hidromiel (T1) además de las sustancias posbióticas (T4), por tanto, la población de lactobacilos que recibieron estas abejas fue inferior a la suministrada en los tratamientos T2 y T3, donde además de la hidromiel, el biopreparado (T2) y las células de L31 (T3) aportan bacterias viables ( $10^6$  ufc.mL<sup>-1</sup>) de este microorganismos (L31).

Por otra parte, estos resultados se encuentran en correspondencia con los conteos de viables realizados a la hidromiel ( $1 \times 10^4$  ufc.mL<sup>-1</sup>) y al biopreparado probiótico ( $3,2 \times 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup>). A la vez, se asocian, a los conteos de lactobacilo realizados a partir del contenido intestinal de las abejas de los tratamientos T1, T2 y T3. El suministro del aditivo microbiano favoreció la presencia de esta bacteria en el TGI de las abejas evaluadas (anexo 1).

En la figura 8 se muestra como las abejas que recibieron el biopreparado y las células de lactobacilo L31 (T2 y T3) en la hidromiel, tienen mayor población de esta

bacteria en su contenido intestinal. En los tres momentos de muestreo los conteos de lactobacilos de los tratamientos T2 y T3 superan al T1 (control).



**Figura 8:** Conteo de *Lactobacillus* aislados del tracto digestivo de abejas con diferentes tratamientos. Para ambos casos  $P < 0,0001$ .  $EE = 0,0009$  (3 días);  $EE = 0,0025$  (6 días);  $EE = 0,0023$  (10 días).

En correspondencia con este resultado se observó que el consumo de alimento también difiere ( $P < 0,05$ ) entre grupos experimentales. En la tabla 7 se muestra el consumo del alimento artificial por tratamientos. Los T2 y T3 fueron los que mayor consumo realizaron durante el ensayo, seguidos por los T1 y T4.

**Tabla 7:** Consumo de jarabe durante el ensayo *in vivo*.

Tratamientos	Consumo (mL.d <sup>-1</sup> )	EE	P
<b>1 hidromiel (control)</b>	10,72 <sup>c</sup>	0,34	0.001
<b>2 (hidromiel + biopreparado)</b>	18,16 <sup>a</sup>	0,33	
<b>3 (hidromiel + células de L31)</b>	13,52 <sup>b</sup>	0,27	
<b>4 (hidromiel + sustancias posbióticas)</b>	8,85 <sup>d</sup>	0,57	

a, b, c, d Medias con letras distintas difieren para  $P < 0,05$  (Duncan, 1955). EE. Error estándar.

Truong *et al.* (2023) estudiaron la comunidad microbiana de las abejas y demostraron que los lactobacilos aislados de ellas tienen potencial para ejercerse

como cepas probióticas. La presencia de esta bacteria en las abejas incrementa el estado de *eubiosis* y proliferan las bacterias nativas o beneficiosas del tracto gastrointestinal, lo cual mejora la fisiología y salud de estos insectos.

### **3.2 Valorar el potencial económico, social y ambiental del biopreparado probiótico a nivel de producción.**

La apicultura analizada desde el punto de vista agroecológico, implica un reto, debido a que es una actividad que beneficia tanto al hombre como a su entorno, además, económicamente cobra un rol sustancial. El papel que juegan las abejas en el medio ambiente es fundamental; su labor de polinización es insustituible. Sin polinizadores, un tercio de nuestra alimentación desaparecería. De ahí, la importancia de garantizar la salud y la productividad de las abejas.

La apicultura es valorada por los productos que se obtienen de ella y todos con alto valor biológico, por lo que resulta imprescindible garantizar las buenas prácticas de manejo en los apiarios y su entorno. Debido a los servicios que prestan las abejas en la polinización de cultivos, se hace necesario mantener un control sobre el uso de los agroquímicos empleados para desarrollar la agricultura. Estos aún usados en dosis bajas repercuten en la salud de las abejas. Además, se emplean acaricidas e insecticidas, para el control de plagas y enfermedades, que dejan residuos tóxicos para las abejas y contaminantes químicos en sus producciones.

Los biopreparados probióticos son productos naturales, inocuos y seguros, que no dejan residuos químicos en los animales que lo consumen, ni en sus producciones. Además, como se ha expresado anteriormente reportan beneficios para la salud y juegan un importante papel en la prevención de enfermedades. Estos aditivos microbianos contribuyen a desarrollar el sistema inmune y hacen a las abejas más resistente a las adversidades de su entorno.

Desde el punto de vista ambiental, el uso de un biopreparado probiótico puede traer consigo un impacto positivo, ya que, si contamos con abejas sanas y más resistente a las enfermedades, disminuye la pérdida de sus poblaciones e incrementa el número de abejas, las cuales tienen como función imprescindible la polinización de

las plantas. A su vez aumenta la producción de miel y los productos de la colmena. Esto beneficia el incremento de la producción apícola, trae consigo un valor económico significativo para los apicultores, eleva la inocuidad y garantiza la seguridad alimentaria de los consumidores, en aras de mitigar riesgos en la cadena productiva de la miel.

Las abejas melíferas se alimentan de manera natural de miel, polen, néctar y agua, de acuerdo a su entorno, salen a la búsqueda de los alimentos solicitados por la colmena para mantenerse vivas, desarrollarse y multiplicarse. Sin embargo, en el transcurso de la temporada de escasez alimentaria, el apicultor tiene que intervenir para mejorar el estado general de la colmena.

En Cuba esta temporada transcurre entre el mes de agosto y la primera quincena de septiembre; por lo que el apicultor debe apoyar la alimentación de las poblaciones de abejas con un jarabe suplementario a base de azúcar cruda y agua donde se mezclan en una proporción de 25% de azúcar y 75% de agua.

Debido a la ausencia en el mercado estatal y los altos precios del azúcar en el sector privado, los productores han creado alternativas para asegurar la alimentación de sus abejas y sustituir el azúcar crudo por la miel de tercera clase. Esta miel no cumple los parámetros de comercialización y exportación, por lo que los productores la utilizan como jarabe suplementario, en una proporción 1:1, para aplicarla en la época de hambruna.

En un apiario de 35 a 40 colmenas se les suministra, como promedio, 1,5 L de jarabe por colmena. En un mes, se invierten 60 L por semana para alimentar al total de las abejas. En temporada de escasez alimentaria se tiene que invertir 2,4 t de miel de tercera clase con un precio de 15000 CUP, generando un costo total de 36000 CUP. El biopreparado probiótico, a un costo de 30,43 CUP por litro, se pudiera agregar a este jarabe y además de reforzar su calidad le daría un valor agregado al mismo. Su impacto será significativo y contribuye a la conservación de la biodiversidad, la sostenibilidad de los ecosistemas, beneficiará tanto a los apicultores como a la sociedad y al medio ambiente en general.

## CONCLUSIONES

1. El biopreparado elaborado presenta la calidad adecuada para la evaluación de la toxicidad *in vivo* en las abejas, con un pH de 4,32 y una población de *Lactobacillus* L31 superior a  $10^{12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>
2. Las abejas no muestran signos de intoxicación ante la ingestión de hidromiel con el biopreparado.
3. La aplicación del biopreparado probiótico redujo la mortalidad en la población de abejas durante el ensayo *in vivo*.
4. La ingestión del biopreparado con potencial probiótico incrementó la población de *Lactobacillus* en el trato digestivo de las abejas.
5. El biopreparado probiótico, a un costo de 30,43 CUP por litro, tiene potencial para utilizarse en la apicultura. Constituye una alternativa para la mejora de la productividad y la salud de las abejas y su impacto será significativo en la conservación de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas.

## **RECOMENDACIONES**

1. Concluir las investigaciones del biopreparado con potencial probiótico para su posterior producción y comercialización entre los apicultores del país.
2. Extender los ensayos realizados a nivel de campo para determinar los efectos del biopreparado en la productividad y la salud de las colonias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alippi, A. M. & López, A. C. 2018. *Bacillus thuringiensis*: aplicaciones en apicultura y producción de miel. Boletín de Sanidad Apícola, (9), 1-12.
- Al-Ghamdi, A., Al-Abbadi, A. A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Ahmed, A. M. & Ansari, M. J. 2020. "In vitro antagonistic potential of gut bacteria isolated from indigenous honey bee race of Saudi Arabia against PaeniBacillus larvae". Journal Apicultural Research. 59 (5): 825- 833, ISSN: 0864-0394. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1706912>.
- Almaguer, M. 2018. Apicultura en Cuba: situación actual y perspectivas de desarrollo. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 44(2), 1-10.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J. & Zunino, P. 2012. American Foulbrood in Uruguay: Twelve years from its report. Journal of Invertebrate Pathology 110:129-131.
- Arguedas, M., Soto, J. F., Ramírez, M. & Calderón, R. A. 2020. Distribution of small hive beetles, *Aethina tumida*, in Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in different beekeeping areas of Costa Rica. Rev. Ciencias Veterinarias, 38(2), 3-29. ISSN: 2215-4507. doi: <https://doi.org/10.15359/rcv.38-2.2>.
- Audisio, M. C. 2017. Microorganismos beneficiosos para la abeja melífera, pág 11. Disponible en <https://www.opia.cl/601/w3-article-91670.html>. Consultado: marzo 28, 2019
- Audisio, M. C., Sabaté, D. C. & Benítez-Ahrendts, M. R. 2018. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. Research in Microbiology, 163(3), 182-187.
- Audisio, M.C. & Benítez-Ahrendts, M.R. 2011. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. Beneficial Microbes 2: 29-34.

- Basualdo, M. & Ramos, O. 2017. Caracterización de la producción apícola. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Departamento de Producción Animal. Buenos Aires, Argentina: UNCPBA. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/Zootecnia/images/apiculurazootecnia.pdf>.
- Bello, M. M., Capdevila, Y. & Gonzáles, O. 2022. Evaluación de los resultados del Plan de vigilancia de residuos químicos en la miel de abejas en Cuba. IV Convención Internacional de Salud. Memorias de Eventos.
- Blanco, L. 2023. Que es la apis mellifera. Disponible en: <https://www.lifeder.com/apis-mellifera/>
- Cardinal, S., Danforth, B. N. & Praz, C. J. 2018. The Bee Genera of Eastern Canada. Canadian Journal of Arthropod Identification, 36.
- Carrasco-Letelier, L., Mendoza, Y. & Ramallo, G. 2012. Acute Contact Toxicity Test of Oxalic Acid on Honeybees in the Southwestern Zone of Uruguay. Scientific Note. Chilean Journal of Agricultural Research 72(2). Online ISSN 0718-5839.
- Carvajal, R. I., Silva-Mieres, F., Ilabaca, A., Rocha, J., Arellano-Arriagada, L., Zuniga Arbalti, F. A., García-Cancino, A. 2023. Insolation and characterization of Lactobacillus casei A14.2, a strain with immunomodulating activity on Apis mellifera. Saudi Journal of Biological Sciences, 30 (4). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103612>
- Cepero, A. 2016. Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la detección de alertas y riesgos sanitarios . Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España: Disponible en: <https://eprints.ucm.es/38839/1/T37640.pdf>.
- Corona, M. 2016. Anatomía y biología de la abeja. Obtenido de Corona apicultores: <http://coronaapicultores.blogspot.com/search/label/biolog%C3%ADa%20de%20la%20abeja>.

- Crane, E. 1999. The world history of beekeeping and honey hunting. Routledge.
- de Melo, M. 2018. Evaluation of probiotic microorganisms in feeding broilers. 80 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/30516>.
- de la Torre, P. E. 2022. Datos morfométricos de *Acarapis woodi* (Rennie) colectados en Mayabeque, Cuba. *Revista Ibérica de Aracnología*, 41, 158–162. ISSN: 1576 - 9518.
- Díaz, A. 2017. Caracterización de los apicultores en Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas*, 51(4), 435-443.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. Test *Biometrics* 11:1.
- Ebeling, J., Fünfhaus, A. & Genersch, E. 2021. The Buzz about ADP-Ribosylation Toxins from *Paenibacillus* larvae, the Causative Agent of American Foulbrood in Honey Bees. *Toxins (Basel)*, 13(2), 151. doi: 10.3390/toxins13020151.
- FAO. 2018. La polinización: clave para la seguridad alimentaria. Recuperado de <http://www.fao.org/3/i9527es/i9527es.pdf>
- Fernández, K. J., Solenzal, Y., Seoane, M., Sánchez, Á., Ramírez, N. & Mora, A. 2016. Diagnóstico de *Acarapis Woodi* Rennie en apiarios de Sancti Spíritus, Cuba 2005-2013. Monografía. <https://www.monografias.com/trabajos107>.
- Figueroa, C. G. & Arechavaleta-Velasco, M. E. 2018. Prevalencia de la acariosis traqueal y niveles de infestación de *Acarapis woodi* en colonias de abejas de Morelos, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. ISSN: 20071124.
- Florencia, A. A., Gómez, J. S. & Salomón, V. 2018. Potencial probiótico de cepas de *Bacillus* aisladas de miel y polen de Tucuman. XXVI Jornada de Jóvenes Investigadores. Universidad Nacional del Guayo, Argentina.
- Fonte, L. 2022. Base alimentaria y estado de salud en colmenas de dos meliponarios de Matanzas y Mayabeque, Cuba. Tesis presentada en opción

al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. Mayabeque, Cuba.

- Forsgren, E., Budge, G. E., Charriere, J. D. & Hornitzky, M. A. Z. 2013. Standard methods for European foulbrood research. J. Apic. Res., 52 (1) 1–14. doi 10.3896/IBRA.1.52.1.12.
- Fundación Amigos de las Abejas. 2021. <https://abejas.org/las-abejas/patologias-de-las-abejas/acarapisosis/>.
- García, M. 2020. Abejas melíferas: especies y características. Disponible en: <https://www.expertoanimal.com/abejas-melíferas-especies-y-características-23775.html>
- González, A. 2017. La apicultura en Cuba: situación actual y perspectivas.
- González, J. & Rodríguez, L. 2016. La apicultura en Cuba y su relación con la agroecología. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, 7(1), 71-79.
- Gutiérrez, S. C. 2021. Trabajo en equipos de las abejas. Disponible en: <https://seminarioiiuntref.wordpress.com/2021/08/15/trabajo-en-equipo-de-las-abejas/>
- Hernández, J.E.G., Rodríguez, J.A.D., Estrada, O.C., Solenzal, Y. V., Fernández, K. L. & Rondón, A.J.C. 2021. "Potencialidades del empleo de aditivos zootécnicos en la apicultura cubana". Pastos y Forrajes. 44: eE14, ISSN: 0864-0394.
- ICA. 2022. Guía sanitaria para el manejo, preservación, protección y conservación de la apicultura. CODIGO: PRA-SPA-G-014 V.2 <https://hachichie.com/interest/hachi-type/>.
- Ivars, J. 2021. Quien es quien en la colmena: una sociedad muy estructurada. Disponible en: <https://www.latiendadelapicultor.com/blog/quien-es-quien-en-la-colmena-una-sociedad-muy-estructurada/>
- Jiménez González, A., Cedeño Loo, M. J., Vera Salazar, L. M. & Blandariz, S. R. 2021. Caracterización de las especies melíferas en el bosque seco tropical orientada a su conservación. Revista Cubana de Ciencias Forestales, 9(3), ISSN 2310-3469. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-34692021000300377](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-34692021000300377)

- Khongphinitbunjong, K., Chantawannakul, P., Yañez, O. & Neumann, P. 2019. Survival of Ectoparasitic Mites *Tropilaelaps mercedesae* in Association with Honeybee Hive Products *Insects*, 10(36),2-4. doi:10.3390/insects10020036.
- Lara, J. M. 2019. Capítulo II: Toxinología Descriptiva / Unidad I: Abejas (*Apis mellifera*). Tesis presentada en opción al título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal. Managua, Nicaragua.
- Lee, S. Hong, Park, S.† & Ricke, S.C. 2015. Assessment of cecal microbiota, integron occurrence, fermentation responses, and *Salmonella* frequency in conventionally raised broilers fed a commercial yeast-based prebiotic compound. Poultry Science Association Inc.
- López, M. & Underwood, R. 2023. Enfermedades de las abejas: Loque americana. PennState Extension. The Pennsylvania State University. Disponible en: <https://pollinators.psu.edu/assets/uploads/documents/Enfermedades-de-la-Abeja-de-Miel-Loque-Americana.pdf>.
- Lóriga-Peña, W., Fonte, L. & Demedio, J. 2014. Reporte de *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae) en colonias de la abeja sin aguijón *Melipona beecheii* Bennett de Matanzas y Mayabeque. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 201–204.
- Machín Sosa, B., Roque Jaime, A. M., Ávila Lozano, D. R. & Rosset, P. M. 2016. Transformaciones de la agricultura cubana. *Revista Biodiversidad*. Disponible en: <https://grain.org/es/article/entries/5603-transformaciones-de-la-agricultura-cubana>
- Manual de enfermedades Apícolas. 2009. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), SAG Tegucigalpa: ISBN13: 978-92-9039-995-7. Disponible en: <http://www.iica.int>.

- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Weinstein, T. E., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Rodríguez, R. D. R. & Eguaras, M. 2016. Honeybee Health in South America. *Apidologie*, 47, 835-854.
- Martínez, J., Gómez, J., González, N., Catzím, F., Sánchez, Y. & Payró de la Cruz, E. 2022. Presencia de *Varroa destructor*, *Nosema* spp. y *Acarapis woodi* en colonias de abejas de Tabasco. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13 (2), 303-315. ISSN en línea 2007-9230.
- Masaquiza, D. A. M., Curbelo, L. M., Díaz, D. L. B. & Arenal, C. A. 2019. "Varroosis and Defense (*Apis mellifera*) Mechanisms of honey bees". *Revista de Producción Animal*, 31(3), ISSN: 2224-7920.
- Mauricio Chamorro, R. E & Valenzuela Dávila, M. 2022. *Apicultura Práctica: Crianza y Explotación. Guía Teórico-Práctico parte I.*
- Milián, G., Rodríguez, M. O., González, O., Rondón, A.J.C., Pérez, M.L.Q., Beruvides, A.R. & Placeres, I. 2021. "Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in productive and health indicators in heavy pure breeds birds under production conditions". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 5(1): 67-75, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Martínez, M. M., Rondón, A. J., & Rodríguez, M. 2023. Use of microbial additives in apiculture. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 57, 1-11. ISSN: 2079-3480.
- Moharrami, M., Mojjani, N., Bagheri, M. & Toutiaee, S. 2022. Role of Honey Bee Gut Microbiota in the Control of American Foulbrood and European Foulbrood Diseases. *Archives of Razi Institute*, 77(4), doi: 10.22092/ARI.2022.358073.2146.
- NC-960 (Norma Cubana). 2018. *Apicultura, Varroosis, Diagnóstico de Laboratorio.*
- NC-961 (Norma Cubana). 2018. *Apicultura, Acarapisosis. Diagnóstico de Laboratorio.*
- NG (National Geographic). 2022. Abejas porque son importantes y cómo podemos evitar su desaparición. Disponible en:

<https://www.nationalgeographicla.com/animales/2022/05/abejas-por-que-son-importantes-y-como-podemos-evitar-su-desaparicion>

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2020. Small hive beetle infestation (Aethina tumida), Colombia. Disponible en: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEven](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEven)
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2021. Varroasis de las abejas melíferas. Disponible en: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>
- Pérez, A. 2017. La apicultura en Cuba y su situación actual. Agroecología, 12 (1), 67-73.
- Pérez, L. 2019. Importancia de las abejas melíferas. Disponible en: <https://abejas.org/importancia-de-las-abejas-meliferas/>
- Pérez, R. 2015. Historia de la apicultura en Cuba. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas, 49(3), 307-315.
- Pérez-Morfi, A. 2020. Influencia de la dieta en indicadores de capacidad de defensa de Apis mellifera africanizada a la nosemosis en condiciones tropicales. Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán, 115. México. Disponible en: <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1766>.
- Rice, L. T. 2023. Características de la abeja melífera: apariencia física, anatomía, ciclo de vida y comportamiento. Disponible en: <https://pollenpaths.com/es/caracteristicas-de-la-abeja-melifera/>
- Rodríguez, M. E. 2019. Determinación de toxicidad de pesticidas sobre abejas melíferas adulta. Tesis en opción al título de Licenciado en Biología. Universidad de la Plata. Argentina.
- Rodríguez, R. 2018. Probiotic administration in honey bee colonies: towards an alternative treatment for American foulbrood. Journal of Apicultural Research, 57(5), 681-687.
- Rondón, A.J., Socorro, M., Beruvides, A., Milián, G., Rodríguez, M., Arteaga, F., & Vera, R. 2020. Probiotic effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO®

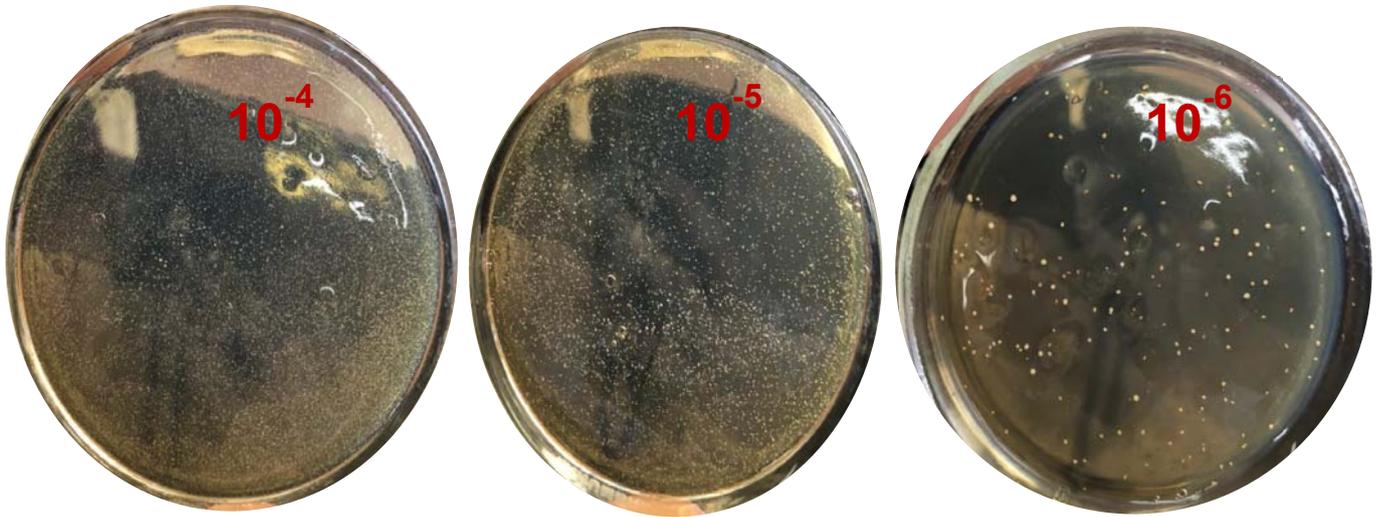
and their mixture on productive and health indicators of growing pigs. Cuban Journal of Agricultural Science, 54(3), 1-13.

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802020000300345](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000300345)

- Rondón, A.J. (2009). Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana.
- Ruíz, G. B., Retamoso, R. M. & Benítez, A. M. 2021. "Bacillus subtilis inhibition tests on fungus transported by invasive ants from honeybee hives". AGRARIA. 37(3):87-92, ISSN: 0719-3882. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-28bsgm30028>.
- Sales Favà, L., Sapoznik, A. & Whelan, M. 2021. Beekeeping in late medieval Europe: A survey of its ecological settings and social impacts. Revista Anales de la Universidad de Alicante. Historia Medieval. 22: 275-296, ISSN 2095-9747. Disponible en: <https://doi.org/10.14198/medieval.19671>
- Salomón, R. 2018. Cuba, el potencial económico de las abejas. Fuente: Prensa Latina. Portal CUBA.CU.
- Sanford, M. T. 2010. A brief history of beekeeping in the United States. American Bee Journal, 150(4), 385-388.
- SEFC (Seminario Económico y Financiero de Cuba). 2019. Miles de abejas con potencial económico. Publicado 31 de enero del 2019.
- Shakib, V. & Mehdi, E. S. 2016. Unprecedented first record of infestation level *Acarapis woodi* (Rennie) and overwintering ability in Savojbolagh regions of Alborz province in Iran. J. Entomol. Zoology Stud, 4,1-13.
- Sierra, R. 2022. Apicultura en cuba el reto de crecer y diversificarse. Disponible en: <https://www.opciones.cu/cuba/2022-03-23/apicultura-en-cuba-el-reto-de-crecer-y-diversificarse>
- Statgraphics. 2002. Statgraphics Plus version 5.1. Statgraphic Technical Support Center. Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA

- Suárez, D., Vargas, D. & Estévez, Y. 2017a. Sensorial description of PANMIEL as a nutritional complement. *Apiciencia* XIX (1):14-26.
- Truong, A. T., Kang, J. E., Yoo, M. S., Nguyen, T., Youn, S., Yoon, S. & Cho, Y. S. 2023. Probiotic candidates for controlling *Paenibacillus* larvae, a causative agent of American foulbrood disease in honey bee. *BMC Microbiol*, 23(1), 150. doi: 10.1186/s12866-023-02902-0.
- Vargas, D., Estévez, Y. & Suárez, D. 2017. Sensorial description of PROPOMIEL as a nutritional complement. *Apiciencia*. XIX (1): 27-39.
- Vásquez Romero, R. E., Ortega Flórez, N. C., Martínez Sarmiento, R. A. & Maldonado Quintero, W. D. 2022. *Manual Técnico de Apicultura Abeja (Apis Mellifera)*. ISBN: 978-958-740-09.
- Verde, M. & Bande M. J. 2017. *Principales Enfermedades de la abeja melífera. Medidas de Lucha y Control*.
- Vergara, C. H. 2008. *Apicultura en América Latina: historia y perspectivas*.

**Anexos**



**Anexo 1. *Lactobacillus* aislado del contenido intestinal de abejas que consumieron hidromiel con biopreparado probiótico**