

PROPUESTA DE PROYECTO

*Evaluación del efecto antimicrobiano de un  
biopreparado probiótico frente a agentes patógenos de  
Apis mellifera L.*



**Autora:** Dalia García Rondón

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

**Matanzas, 2019**

## PENSAMIENTO

*Si las abejas desaparecieran, solo nos quedarían 4 años.*

*Albert Einstein*

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Presidente del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

Dado en Matanzas, el día 8 del mes de julio del año 2019.

“Año del 61 de la Revolución”

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD**

Declaro que yo: Dalia García Rondón soy la única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas, hacer uso del mismo con la finalidad que considere pertinente.

---

Dalia García Rondón

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi mamá y a mi papá por todo su apoyo y dedicación en estos cinco años de carrera.

Se lo dedico además a mi hermano, mis abuelos, tías y mi querido sobrino.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, quiero agradecer a mis tutoras Ana Julia Rondón Castillo y Marlene María Martínez Mora por haber confiado en mí por en este proyecto de tesis.

A mi familia en especial a mi madre y mi padre.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas por su dedicación durante todos estos años.

## **Opinión de los Tutores**

El presente trabajo de diploma titulado: Evaluación del efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico frente a agentes patógenos de *Apis mellifera* L., de la estudiante Dalia García Rondón, constituye una propuesta de proyecto dirigida a mejorar la salud de las abejas. La investigación que se proyecta tiene gran importancia, ya que se ubica en el programa Seguridad alimentaria, producción, calidad y sostenibilidad, específicamente en la línea de Producción de alimentos. Este proyecto pretende investigar en apoyo al desarrollo de los fondos exportables de la provincia, propiciar la seguridad alimentaria y la búsqueda de estrategias de adaptación al cambio climático, fundamentalmente para evitar la pérdida de las colmenas.

La estudiante trabajó desde tercer año de la carrera vinculada al Grupo de Aditivos nutricionales del Centro de Estudios Biotecnológicos, donde desarrolló un serio y sistemático trabajo en la búsqueda de información para seleccionar los diferentes protocolos de investigación y diseñar las diferentes etapas del proyecto. La propuesta de investigación fue presentada en la Jornada Científica estudiantil de la Facultad, donde alcanzó el premio de mención.

Con el desarrollo y la formación alcanzada en esta investigación le permitió a la estudiante proponer un nuevo proyecto con posibilidades reales de ser aprobado como Proyecto CITMA territorial o como una tarea dentro del Proyecto VIDA.

La estudiante logró en esta etapa de su formación un alto nivel de independencia, lo que le permitió realizar con éxito la propuesta de proyecto. El trabajo desarrollado posee una amplia revisión bibliográfica actualizada en la temática que se aborda, así como, la utilización adecuada del idioma Inglés y de las técnicas de la informatización.

### Tutoras de la Tesis:

Lic. Ana Julia Rondón Castillo, Dr.C.

Lic. Marlene María Martínez Mora, MSc.

## RESUMEN

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) son los principales agentes polinizadores de cultivos comerciales y de la flora silvestre. 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; sin embargo, las abejas pueden infectarse por diferentes patógenos, entre los cuales se encuentran enfermedades producidas por ácaros, bacterias, hongos y virus, las cuales no se tratan con antibióticos u otras sustancias químicas, de ahí que cuando ocurren grandes infestaciones se practica la quema de las colmenas. En el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas se trabaja con biopreparados probióticos con efectos antimicrobianos, de ahí que el presente trabajo constituye una propuesta de proyecto que tiene como objetivo: Evaluar el efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico, obtenido a partir de la microbiota del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B., frente a microorganismos patógenos de *Apis mellifera* L. Se realizó la búsqueda de la información para la fundamentación, el diseño de métodos y procedimientos de cada etapa de la investigación, así como de la relación de los recursos y el presupuesto necesario. Se culmina con el cálculo de un presupuesto global de 39722,00 pesos para la ejecución del proyecto en cuatro años, lo que pudiera contribuir a reducir el índice de enfermedades en las abejas y la quema de las colonias, para así garantizar la polinización y el cuidado del medio ambiente. Se aumentará además la producción de miel con fines exportables.



## **ABSTRACT**

Honey bees (*Apis mellifera*) are the main pollinating agents of commercial crops and wild flora. In Cuba, honey from bees and their derivatives are one of the most important exportable items of the Agroforestry Business Group, of the Ministry of Agriculture; however, bees can be infected by different pathogens, among which are diseases caused by mites, bacteria, fungi and viruses, which are not treated with antibiotics or other chemical substances, hence when large infestations occur, burning is practiced of the hives. At the Biotechnological Studies Center of the University of Matanzas, we work with probiotic biopreparations with antimicrobial effects, which is why the present work is a project proposal that aims to: Evaluate the antimicrobial effect of a probiotic biopreparation, obtained from the microbiota of the digestive tract and honey of *Melipona beecheii* B., against pathogenic microorganisms of *Apis mellifera* L. We searched for the information for the rationale, the design of methods and procedures of each stage of the investigation, as well as the list of resources and the necessary budget. It culminates with the calculation of a global budget of 39722.00 CUP for the execution of the project in four years, which could contribute to reduce the rate of diseases in bees and the burning of colonies, in order to guarantee pollination and environmental care. The production of honey for export purposes will also be increased.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Problema</b>	3
<b>3. Hipótesis</b>	3
<b>4. Fundamentación</b>	4
4.1 Importancia de las abejas melíferas ( <i>Apis mellifera</i> )	4
4.2 Historia y desarrollo de la apicultura en Cuba	5
4.3 Importancia de las abejas melíferas en Cuba	6
4.4 Características generales de <i>Apis mellifera</i>	6
4.5 Anatomía digestiva de <i>Apis mellifera</i>	7
4.6 Comunidad intestinal de la abeja melífera y su rol en la nutrición y salud de la colmena	8
4.7 Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Cuba	12
4.7.1 <i>Paenibacillus larvae</i>	12
4.7.2 <i>Nosema ceranae</i>	15
4.7.3 <i>Varroa destructor</i> y virus ARN	16
4.8 Barreras naturales que protegen a <i>Apis mellifera</i> de las enfermedades. Sistema inmune de las abejas	18
4.9 Características de la abeja melipona ( <i>Mellipona beecheii</i> )	20
4.10 Comunidad microbiana intestinal de la abeja de la tierra	21
4.11 Uso de los insectos en la biotecnología	21
4.12 Métodos empleados para la evaluación del efecto de microorganismos probióticos en abejas	23
4.13 Probióticos y su uso en las abejas melíferas	24
4.13.1 Concepto de probióticos	24

4.13.2 Principales microorganismos utilizados como probióticos en las abejas. Criterios de selección de los microorganismos con potencial probióticos en las abejas	25
4.13.3 Efectos de aplicación de probióticos en <i>Apis mellifera</i>	26
<b>5. OBJETIVOS</b>	29
<b>6. RESULTADOS ESPERADOS</b>	30
<b>7. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS: CRONOGRAMA</b>	31
7.1. 1era etapa: Revisión del Estado del arte	31
7.2. 2da Etapa: Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo y la miel de <i>Melipona beecheii</i> B.	32
7.2.1. Etapa 2.1 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo de <i>Melipona beecheii</i> B	32
7.2.2. Etapa 2.2 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> B.	33
7.2.3. Etapa 2.3 Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.	35
7.3. 3era Etapa: Optimización de un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de las cepas candidatas a probióticos	40
7.4. 4ta Etapa: Evaluación a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en larvas y abejas adultas desafiadas con <i>Paenibacillus larvae</i> y <i>Nosema ceranae</i>	41
7.5. CRONOGRAMA	43
<b>8. RECURSOS NECESARIOS Y PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO</b>	44
<b>9. EVALUACIÓN ECONÓMICO – FINANCIERA</b>	49
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	50

# *Introducción*

## 1. INTRODUCCIÓN

La apicultura o el cultivo de abejas es una actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas (*Apis mellifera* L.). Esta actividad genera varios impactos positivos, entre los cuales cabe destacar el importante rol que desempeñan las abejas melíferas en el mantenimiento de casi toda la vida en la tierra, pues son los principales agentes polinizadores de cultivos comerciales y de la flora silvestre (Arredondo, 2015). Además, intervienen en la producción de gran cantidad de productos de interés industrial como la miel, cera, jalea real, propóleos, veneno de abejas, entre otros productos (SEFC, 2019). Sin embargo, a pesar de su importancia, actualmente en el mundo se aprecia una disminución del número de colmenas.

El aumento de la mortalidad de las abejas es atribuible a múltiples factores de estrés que varían en función de la zona geográfica, las características locales o las condiciones climáticas; y entre estos factores figuran el grave impacto de las especies exóticas invasoras, como el ácaro *Varroa destructor*, el pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*), la avispa asiática (*Vespa velutina*) y *Paenibacillus larvae* (agente causal de la Loque americana), entre otros (Burnham, 2019). También se debe tener en cuenta los efectos de otros patógenos animales como la nosemosis y de los efectos de ciertas sustancias activas presentes en los productos fitosanitarios y biocidas, el cambio climático, la degradación ambiental, la degeneración de los hábitats y la desaparición progresiva de las angiospermas (Manzano, 2018).

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, al aportar anualmente ingresos de unos 20 millones de dólares. 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).

Debido al estilo de vida colonial de las abejas, ellas pueden infectarse con una gran variedad de patógenos, entre los cuales se encuentran enfermedades producidas

por ácaros, bacterias, hongos y virus (DeGrandi y Chen, 2015). En Cuba, cuando se producen grandes infestaciones por estos patógenos no se aplican medicamentos, antibióticos ni sustancias químicas para el tratamiento de las patologías de las colmenas, solo se practica el Manejo Integrado, que consiste en el saneamiento de las colmenas, la castra en el apiario, para evitar el transporte de miel o panales infectados, el cambio de abejas reinas y de ser necesario, se realiza el sacrificio de las colmenas si se detectan brotes de enfermedades infecciosas graves, lo que trae consigo la disminución de las poblaciones de estos insectos (Pérez, 2017).

Sin embargo, la abeja *Melipona beecheii* Bennett, que pertenece al grupo de las “abejas sin aguijón” y se conoce en Cuba como “abeja de la tierra”, a diferencia de *Apis mellifera* L., es más resistente a la mayoría de estas enfermedades y se considera como un género barrera que previene las infecciones (Fernández *et al.*, 2018). Vásquez (2014) refiere que las infecciones en estas abejas suelen ser menos exitosas por su estilo de vida, dotándola de una defensa extra contra diferentes tipos de patógenos, lo que beneficia su sistema inmune.

La dependencia alimentaria de las abejas con la microbiota asociada, es un tópico que adquiere gran interés en la comunidad internacional, debido al impacto que pueden tener en la nutrición y el fortalecimiento del sistema inmune. Es necesario reconocer que los microorganismos son parte de la dieta de las abejas y su uso dentro de las actividades apícolas es una ventana de oportunidad en la investigación de la salud de las colmenas (Anon, 2018).

Especialistas del grupo de Aditivos nutricionales del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas, cuentan con la experiencia necesaria para la obtención de biopreparados probióticos y su aplicación en animales de interés zootécnico. Se conoce que los probióticos inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos, constituyen la primera barrera del sistema inmune, mejoran la digestibilidad de los nutrientes y el rendimiento productivo de los animales.

## **2. Problema científico**

En los apiarios se presentan microorganismos patógenos que provocan enfermedades en las abejas que inciden en la despoblación de las colmenas.

## **3. Hipótesis**

La obtención de un biopreparado probiótico con actividad antimicrobiana, elaborado a partir de la microbiota del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B., permitirá inhibir a microorganismos patógenos de *Apis mellifera* L.

# *Fundamentación*



## **4. FUNDAMENTACIÓN**

### **4.1 Importancia de las abejas melíferas (*Apis mellifera*)**

Las abejas son imprescindibles para el ciclo de la vida en la tierra y desarrollan tareas muy importantes en el medioambiente. Son los principales insectos encargados de la polinización y eso es esencial para la producción de alimentos, la diversidad biológica y la manutención de ambientes amenazados. La polinización permite la reproducción de las plantas, lo que da lugar a la producción de frutos y de semillas (Paseyro, 2017). Se conoce que en los bosques tropicales, alrededor del 70% de los árboles son monoicos y por lo mismo, dependen de polinizadores para su reproducción. De estos, cerca del 80% son polinizados por insectos, y entre el 40-50% son abejas (Red por una América Libre de Transgénicos, 2016).

Estos insectos tienen gran importancia debido a la producción de miel, ceras, propóleos, las cuales se utilizan para la generación de productos alimenticios, cosméticos, farmacológicos (Paseyro, 2017).

La abeja melífera (*Apis mellifera*) es el polinizador más importante en la agricultura mundialmente. Sin embargo, desde el año 2006 hasta el día de hoy, un decrecimiento anormal de las colonias de abejas tiene lugar, fenómeno conocido como desorden del colapso de las colonias (CCD). El CCD se describe como el abandono aparentemente espontáneo de las abejas obreras de las colmenas y las reinas se quedan acompañadas de un grupo pequeño de abejas nodrizas. Las causas específicas de este desorden se desconocen, pero existen algunos factores que pueden incidir como: las plagas y enfermedades; el uso de químicos en las colonias de abejas y su ambiente circundante; las prácticas de mantenimiento de las abejas; las prácticas agrícolas y el cambio climático (Asenjo *et al.* 2016).

### **4.2 Historia y desarrollo de la apicultura en Cuba**

La apicultura en Cuba tiene su origen entre 1763 y 1764, a raíz del regreso a la Habana de los colonos españoles. La abeja cubana actual surge a partir del

resultado de la mezcla de abejas negras europeas (*Apis mellifera*) y abejas amarillas (*Apis mellifera ligustica*), las cuales se introdujeron desde el actual territorio de los Estados Unidos de Norteamérica (Pérez, 2017).

El desarrollo de la apicultura a partir de 1959, con una flora melífera empobrecida por siglos de explotación forestal indiscriminada, encontró que en esos años se alcanzaban producciones de miel de unas 2 000 – 3 000 t anuales. En 1964 se crea el sector apícola estatal y durante la segunda mitad de la década de los sesenta y en los setenta, el crecimiento fue constante. La construcción de nuevas carreteras y camiones, permitió el acceso a zonas de vegetación antes no explotadas como la Ciénaga de Zapata y los bosques de manglares tanto de las costas norte y sur; todo ello permitió valorizar especies melíferas importantes y lograr la producción de nuevos tipos de mieles: miel de mangle prieto, miel de soplillo, miel poliflora de las zonas costeras (Pérez, 2017).

La producción nacional de miel alcanzó un record en 1983 con 10 212 t, ese fue el resultado del desarrollo de una apicultura de altos rendimientos, basada en la trashumancia hacia zonas identificadas como de gran potencial melífero. La crisis económica de los años 90 y los fenómenos climatológicos posteriores como las sequías de 2004-2005 y los huracanes del 2008, afectaron la producción de miel y su recuperación, debido a los grandes daños ocasionados a la flora melífera y a la vegetación en general del país, especialmente a la zona occidental (Delgado *et al.*, 2016). No obstante, el Programa de Desarrollo de la Apicultura en Cuba hasta el 2030 prevé inversiones para recuperar y explotar el máximo del potencial melífero del país (Pérez, 2017).

### **4.3 Importancia de las abejas melíferas 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 (Minag), al aportar anualmente ingresos de unos 20 millones de dólares. Actualmente la apicultura produce un promedio de 8 000 toneladas de miel por año,

a partir de la actividad de 186 000 colmenas, con un rendimiento per cápita de entre 40 y 45 kg (Opciones, 2018).

En Cuba 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. En estos momentos, 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.*, 2017a) y PROPIOMIEL (Vargas *et al.*, 2017), o en la cosmética para la elaboración de cremas (Suárez *et al.*, 2017b).

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.

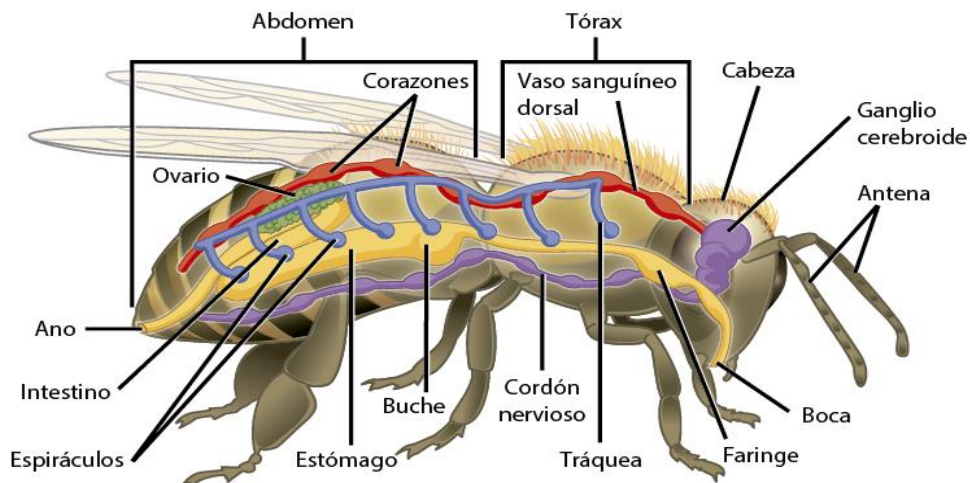
#### **4.4 Características generales de *Apis mellifera***

Se trata de un insecto de color pardo oscuro, con un tamaño aproximado de 1,5 cm en el caso de las obreras y 2 cm la reina y los machos. En la cabeza se encuentran dos ojos laterales compuestos de numerosas facetas y tres puntos brillantes en lo alto, que son ojos simples (ocetos). La boca es de tipo lamedor. El tercer par de patas en las obreras presenta unas cestillas para transportar el polen. El abdomen está visiblemente segmentado y las hembras poseen en el último anillo un aguijón venenoso que se queda fijado en la herida que produce, de manera que el insecto acaba muerto (Santiago, 2013).

Viven en colonias muy numerosas que comprenden tres tipos de individuos. Los machos o zánganos de vida breve y en número limitado, que tienen función reproductora, las obreras que cumplen con la construcción de la colmena, la alimentación de larvas y el aprovisionamiento de víveres y la reina, que es la única hembra fértil, la cual presenta un abdomen muy largo y se dedica exclusivamente a la puesta de los huevos (Santiago, 2013).

#### **4.5 Anatomía digestiva de *Apis mellifera***

En las abejas, a través de la digestión, los alimentos sufren la hidrólisis biológica para quedar reducidos a moléculas más simples, las que pueden ser absorbidas y utilizadas por las células. De esta manera, algunos alimentos, como la sacarosa, deben degradarse en su constitución química a componentes más sencillos, como la glucosa y la fructosa. Lo mismo sucede con los ácidos grasos y proteínas. En estos insectos todos estos procesos bioquímicos ocurren en el aparato digestivo, el cual es un tubo continuo desde la boca hasta el ano, constituido por los siguientes órganos: boca, faringe, esófago, buche y proventrículo, los cuales forman el estómago, el ventrículo, y los intestinos delgado y grueso. Asociados al aparato digestivo están: los túbulos de Malpighi, las glándulas labiales del tórax y la cabeza, las glándulas hipofaríngeas y los órganos rectales (Anon, 2017). En la figura 1 se presentan las partes de este sistema.



**Figura 1.** Anatomía de *Apis mellifera* (Tomado de Anon, 2017).

Mattila *et al.* (2012) y Vázquez *et al.* (2015) refieren que las abejas transforman el néctar de las plantas en miel, la cual provee a la colonia de su fuente primaria de carbohidratos, cantidades de aminoácidos y vitaminas. El polen provisiona a las abejas de casi todos sus nutrientes, entre los cuales se incluyen aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales. Sin embargo, estos compuestos intracelulares no están fácilmente asequibles, ya que cada grano de polen tiene una pared celular químicamente difícil de degradar (presencia de una capa resistente de esporopolenina y otra capa de celulosa).

#### **4.6 Comunidad intestinal de la abeja melífera y su rol en la nutrición y salud de la colmena**

Las asociaciones simbióticas entre bacterias e insectos son comunes en la naturaleza (Tamarit *et al.*, 2015). Según Morán (2015), el tracto digestivo de las abejas contiene una comunidad distintiva de especies bacterianas. Estas son microarófilas o anerobias y no son fácilmente cultivables a nivel de laboratorio. Estas especies incluyen a bacterias Gram negativas como *Gilliamella apicola* y *Snodgrassella alvi*, y Gram positivas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Esta autora plantea que estos microorganismos parecen haber pasado por un proceso

de coevolución a largo plazo con la abeja melífera. El análisis de las funciones de los genes que conforman las secuencias del genoma de estas bacterias indica que juegan un importante papel en la alimentación y la digestión, así como las potencialidades que tienen en la defensa contra agentes patógenos.

García *et al.* (2006) caracterizaron a los microorganismos cultivables asociados con *Apis mellifera* y aislaron bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Arthrobacter* y hongos de los géneros *Rhizopus*, *Alternaria* y *Epicoccum*. Estos autores afirman que de acuerdo a las propiedades bioquímicas, algunas de estas bacterias intervienen en la degradación de los compuestos de la capa externa del polen y se adquieren a través del alimento y el contacto con otros individuos de la colmena. La presencia de los hongos se explica por su amplia distribución en el ambiente, ya que los tres géneros se encuentran comúnmente en el suelo y en las plantas que las abejas pueden seleccionar como fuente de alimento. Tarpy *et al.* (2015) indicaron que la microbiota de las reinas se adquiere a partir de las obreras y que estas se colonizan entre generaciones producto de las relaciones sociales que se establecen entre ellas dentro de la colmena.

Olofsson *et al.* (2014) reportaron la presencia de nuevas especies de *Lactobacillus* en el tracto digestivo de *Apis mellifera* a las cuales les nombraron *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. y *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov. Corby-Harris *et al.* (2014) también encontraron una nueva especie denominada *Parasaccharibacter apium*.

Rosa *et al.* (2003) estudiaron las comunidades de levaduras asociadas con las abejas sin aguijón *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* y *Frieseomelitta varia*. Las abejas *T. angustula* y *F. varia* mostraron una fuerte asociación con la levadura *Starmerella meliponinorum*. Estos autores observaron que *M. quadrifasciata* fue portadora de una especie relacionada con *Candida apicola*, pero

también transmitía un número bajo de *S. meliponinorum*. Algunas de las levaduras aisladas de abejas adultas eran típicas de especies presentes en las flores. Muchas levaduras se encuentran en abejas o sustratos visitados por ellas, lo que sugiere que existe una interacción mutuamente beneficiosa entre ellas.

Cariveau *et al.* (2014) definieron que la estructura del microbioma en el intestino de las abejas es determinante en la salud de estos insectos. Ludvigsen *et al.* (2015) determinaron la composición microbiana del tracto digestivo de las abejas a través de técnicas de Biología molecular y demostraron la presencia de una microbiota específica para estos animales. En este sentido Kwong y Morán (2015) refieren que muchos de estos microorganismos viven solo en este hospedero y representan un ecosistema ideal para analizar cómo ocurre la coevolución de los simbioses y su contribución a la salud o a la enfermedad. En la tabla 1 se muestra la composición bacteriana observada por estos autores.

**Tabla 1.** Composición bacteriana obtenida de la secuenciación de genes presentes en el contenido del tracto digestivo de abejas melíferas (Ludvigsen *et al.*, 2015).

Composición	Taxonomía asignada	No de accesión en el GenBank	% de identidad
<i>Frischella perrara</i>	<i>Frischella perrara</i>	NR- 118490	96
<i>Gilliamella apícola</i>	<i>Gilliamella apícola</i>	NR- 121727	99
<i>Snodgrassella alvi</i>	<i>Snodgrassella alvi</i>	NR- 122055	95
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AF390084	91
	<i>Pantoea sp</i>	FJ587505	90
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FR828819	
<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	KF599473	89
<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobiales bacterium</i>	JQ673261	99
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> no cultivables	HM112122	87

Los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana nativa del intestino de un individuo es esencial para mantener su correcta nutrición, salud e inmunidad (Gill *et al.*, 2006). En insectos, los microorganismos nativos pueden manipular la reproducción del huésped, contribuir a la nutrición o a la defensa frente a patógenos (Audisio *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015).

Después de recolectarse, el néctar y polen se transforman bioquímicamente antes de consumirse. Como primer paso, el néctar se almacena en el buche de la abeja, donde se adicionan las enzimas provenientes de las glándulas salivares e hipofaríngeas, para facilitar la ruptura de los disacáridos. Sin embargo, las abejas reciben ayuda en esta tarea, pues ellas abrigan en sus partes bucales a microorganismos que también están presentes en el néctar y quienes, a su vez, adicionan sus enzimas para acelerar la transformación del alimento (Anon, 2018).

Por su parte Engel *et al.* (2012) refieren que a través del análisis comparativo de los genes de las bacterias se demuestra que distintas especies presentan un funcionamiento diferente en dependencia de su interacción con el hospedero, como la formación de biofilm y la descomposición de carbohidratos. Estos autores también comprobaron que existen genes en especies de proteobacterias que codifican para la producción de enzimas que intervienen en la descomposición de la pectina presente en las paredes del polen.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son habitantes normales del tracto gastrointestinal, tanto de insectos como de vertebrados, los cuales intervienen en la inmunomodulación, así como en el mantenimiento de la comunidad microbiana intestinal saludable (Mitsuoka, 1992) y en la defensa del hospedero frente a diversas enfermedades (Sartor, 2004; Sartor, 2008).

Corby-Harris *et al.* (2014) refieren que la comunidad microbiana asociada a las abejas depende en gran medida del medio ambiente donde se encuentren. Para demostrar esta afirmación evaluaron la microbiota presente en el tracto digestivo de abejas y en los granos de polen que colectaron en diferentes estaciones del año y



localidades geográficas. Estos resultados coincidieron con los trabajos de Hroncova *et al* (2015), quienes también estudiaron la influencia de la edad o estadio del ciclo de vida. Estos autores concluyeron que durante la etapa larval, el tracto digestivo no es estéril, sino que pueden encontrarse habitado por poblaciones de bacterias en el orden de  $10^8$  UFC.

Rokop *et al.* (2015) estudiaron *in vitro* las interacciones entre bacterias pertenecientes a los géneros *Fructobacillus* y *Lactobacillaceae* específicas para *Apis mellifera*, ya que las mismas colonizan células de las crías, el pan de abeja y el néctar, y al mismo tiempo propician un ambiente adecuado para el desarrollo de otras bacterias. En este sentido estos autores demostraron a través de ensayos con cocultivos que estas especies promueven el crecimiento de bacterias específicas de las abejas melíferas. Particularmente, subproductos de *Fructobacillus* en el medio favorecieron el crecimiento de bacterias del grupo Firm – 5, y comprobaron que utilizan azúcares simples (fructosa y glucosa) y carbohidratos de plantas tan complejos como la lignina.

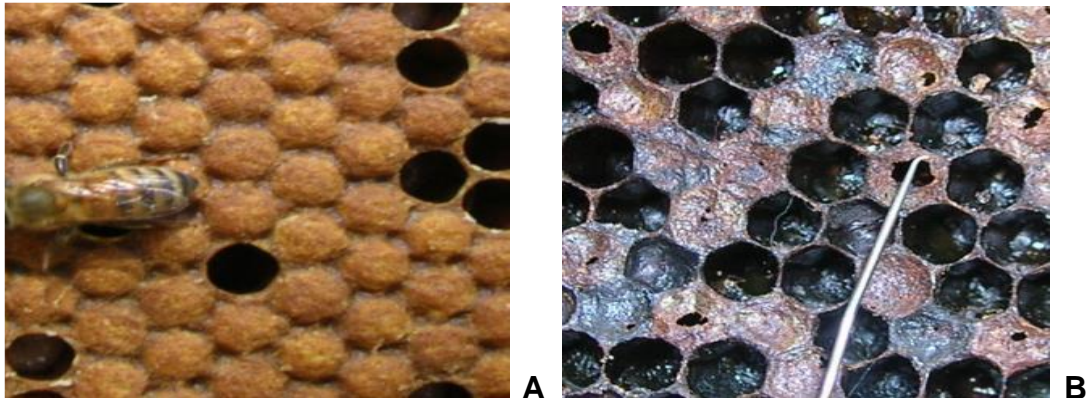
#### **4.7 Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Cuba**

Las abejas como los seres humanos y las plantas se enferman. Las enfermedades más peligrosas para estos insectos pueden llevar a la muerte de la colonia (Goulson *et al.*, 2015; Audisio, 2017). 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)

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

##### **4.7.1 *Paenibacillus larvae***

Es el agente causal de la Loque Americana (L.A), la más destructiva que afecta a la cría de las abejas. *P. larvae* es un bacilo Gram positivo, catalasa negativo, anaerobio facultativo, con bajo porcentaje de GC (Guanina y Citosina) y formador de endosporas (Genersch *et al.*, 2006). En la figura 2 se aprecian las afectaciones de esta bacteria en las larvas de las abejas.



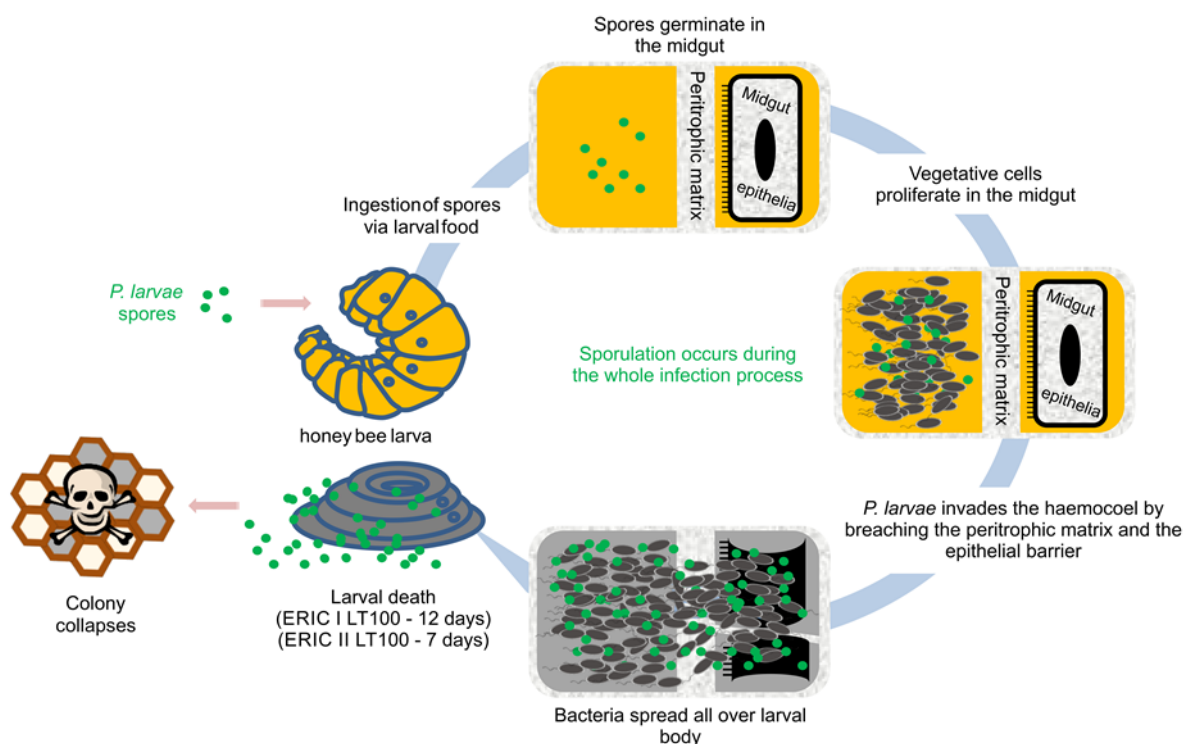
**Figura 2.** Afectación por *Paenibacillus larvae*. **A:** panal sano y **B:** Panal afectado (Tomado de Antúnez, 2018).

Las larvas de las abejas obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas, cuando se alimentan por las abejas nodrizas (Hornitzky, 1998). Una vez ingeridas, las esporas llegan al lumen del intestino larval donde germinan dando lugar a células vegetativas. Estas proliferan y se mueven hacia el epitelio y destruyen las interacciones célula-célula e invaden el espacio intercelular, hasta llegar a la hemolinfa del hospedero de manera muy veloz (Yue *et al.*, 2008). Posteriormente, la larva muere, lo que es acompañado por la esporulación de las células vegetativas. Las esporas se diseminan dentro de la colmena cuando las abejas encargadas de la limpieza contaminan su aparato bucal al remover las larvas muertas y posteriormente, las transmiten a las larvas cuando se alimentan. En la figura 3 se presenta como ocurre la contaminación hasta el colapso de la colonia.

Formas de control de L.A.: Por las características propias de la enfermedad, una vez que se detecta en una región es muy difícil que pueda erradicarse por completo de dicha zona. Las únicas medidas eficaces de control son: destrucción de la

colmena enferma total o parcial por fuego; desinfección de los materiales apícolas por medio de la irradiación con cobalto-60, lavado con soda cáustica e inmersión en parafina (Del Hoyo *et al.*, 1998). También se han combinado estas medidas con la aplicación de antibióticos, como la oxitetraciclina o el tartrato de tirosina. Sin embargo, el uso de antibióticos como tetraciclinas para tratar la L.A. puede tener como resultado una miel contaminada con residuos de antibióticos (Martel *et al.*, 2006). El cloranfenicol ha sido detectado en mieles y en otros productos del apiario en numerosos países (Bogusz *et al.*, 2004). Consecuentemente, los residuos de antibióticos en productos melíferos pueden causar reacciones alérgicas letales o serios efectos colaterales a consumidores hipersensibles.

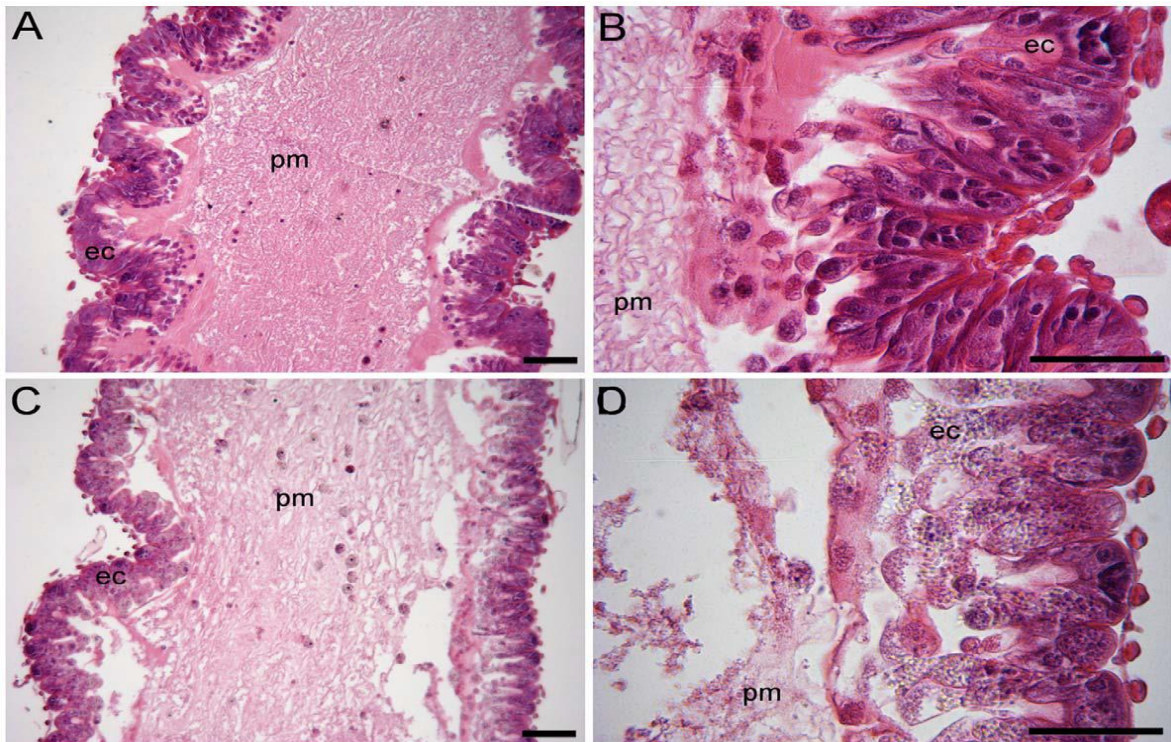
Autores como Alippi *et al.* (2014) observaron la presencia de plásmidos de resistencia a la tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, lo cual indica que el empleo de este antimicrobiano no debe provocar ningún efecto en esta bacteria.



**Figura 3.** Contaminación de las larvas con esporas de *P. larvae* hasta el colapso de la colonia (Tomado de Djukic *et al.*, 2014).

#### 4.7.2 *Nosema ceranae*

*N. ceranae* es un hongo formado por microsporidios los cuales son parásitos intracelulares obligados de los insectos como las abejas. Su infección tiene lugar después de ingerir esporas maduras que germinan en el intestino y forman un tubo que extrude e inyecta el esporoplasma dentro del citoplasma de las células epiteliales (Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2018). En la figura 4 se observan los resultados de los estudios histológicos realizados por Dussaubat *et al.* (2012) al comparar los intestinos de abejas infectados por este hongo a los 7 días de la inoculación. Se aprecia que en los intestinos del control (A y B), la membrana peritrófica (p.m.) y células epiteliales (ec) son homogéneas, mientras que en las parasitadas (C y D) se observan lesiones celulares debido a la actividad destructiva del hongo.



**Figura 4.** Histología del intestino de abeja melífera 7 días post- infección con *Nosema ceranae*. Control (A, B) e intestino infectado con *N. ceranae* (C, D). (Tomado de Dussaubat *et al.*, 2012).

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

Ptaszyńska *et al.* (2014) comprobaron que a medida que aumenta la contaminación de las abejas con este hongo, también se incrementan las levaduras oportunistas, lo que hace que la despoblación de la colmena sea aún más rápida.

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

#### **4.7.3 *Varroa destructor* y virus ARN**

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

*V. destructor* es un ácaro parásito que causa daños en la abeja, debilitándola, al deprimir su sistema inmune y favorecer la infección por otros patógenos, es letal si no se trata adecuadamente (OIE, 2004a; Rosenkranz *et al.*, 2010). Se presenta en

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

En la figura 5 se muestra el ácaro *Varroa destructor* en *Apis mellifera*



**Figura 5.** *Varroa destructor* en *Apis mellifera* (Tomado de Rosenkranz *et al.*, 2010)

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

Este ácaro se alimenta exclusivamente de la hemolinfa (sangre) de las abejas. Se reproduce dentro de la cría de las obreras y los zánganos, con preferencia por estos últimos. *V. destructor* penetra dentro de una celda poco antes de la percolación y pone huevos (primer huevo macho, seguido y consecutivamente hembra) que se desarrollan en el interior de la celda operculada. El macho puede fecundar las hembras que lleguen a la madurez, normalmente una o dos dentro de una celda de obreras y tres o cuatro dentro de una celda de zánganos. (Mendoza *et al.*, 2008). En la figura 6 se aprecia el proceso de contaminación por *Varroa* de las larvas.



**Figura 6.** Contaminación de abejas por *Varroa destructor* (Anon, 2018).

Los síntomas observados son: colmenas débiles, abejas mal formadas, desorganización social, consumo anormal de las reservas de miel, pequeño grupo de abejas débiles y crías salteadas. Las abejas atacadas por ácaros pueden someterse a tratamientos mediante fumigación con pesticida si está disponible (Mendoza *et al.*, 2008). Para el tratamiento y control se recomienda la aplicación de acaricidas orgánicos como el timol, eucalipto, mentol y ácido fórmico. Se deben sacar las crías de zánganos de los panales (temprano en la primavera) (Mendoza *et al.*, 2008)

#### **4.8 Barreras naturales que protegen a *Apis mellifera* de las enfermedades. Sistema inmune de las abejas.**

Las colonias de abejas son objetivos potenciales para predadores y agentes patógenos, debido a la elevada presencia de crías e individuos adultos y por la reserva de miel y polen almacenada en sus celdas. El nivel de humedad mantenido permite que la colonia sea un ambiente formidable para la incubación y desarrollo de agentes patógenos. (Fei, 2006).

Entre los sistemas de defensa individuales, la primera línea de resistencia de la abeja son las barreras mecánicas del tegumento (tejido que forma la pared externa del cuerpo del insecto), y los tejidos epiteliales internos (que recubren órganos e intestinos) que previenen la adhesión y penetración de los agentes extraños al cuerpo del insecto; además produce sustancias antimicrobianas y fungicidas (que actúan sobre agentes patógenos) y posee un sistema inmunitario que entra en juego cuando las primeras barreras de defensa son separadas. (Fei, 2006).

En los sistemas de defensa colectivos existe una diferencia entre defensa preventiva y curativa; en el primer caso, son los mecanismos desarrollados para prevenir la entrada de agentes extraños en la colonia, como el uso del propóleo para sellar y desinfectar la colmena (Fei, 2006).

Las barreras naturales se definen por: mecánicas, químicas y funcionales. Mecánicas: el tegumento, el epitelio intestinal y traqueal. Químicas: las proteínas, las enzimas. Sus funciones son la multiplicación de tejido, la fagocitosis, el encapsulamiento. (Verde, 2013).

Koch y Schmid-Hempel (2011) observaron que la microbiota del tracto digestivo de las abejas disminuía la colonización por *Crithidia bombi*, un parásito intestinal muy común que afecta a las reinas en primavera y hace que entre el 40-50% de estas se contaminen y no puedan fundar la colonia.

Vannette *et al.* (2015) informaron que *Apis mellifera* presenta genes que expresan una alta inmunidad y detoxificación en los tejidos asociados al procesamiento del néctar. En este sentido comprobaron que estos atributos estaban muy pronunciados en la mandíbula y en la glándula hipofaríngea, donde se enriquece en transcritores que codifican para la producción de péptidos antimicrobianos (apicimina, hymenoptaecina y defensin 1) y para la respuesta inmune en defensa del ataque de microorganismos patógenos.

Las brechas de las barreras son provocadas por lesiones, debido a la acción de diferentes agentes etiológicos. En el tegumento actúan patógenos como: *Varroa*



*destructor*, “polillas”, *Tropilaelaps clareae*, *Euvarroa sinhai*, *Melaloncha*; mohos como *Aspergillus* sp. y levaduras que producen quitinosa; en las tráqueas se observa la presencia de *Acarapis woodi*. Estas fisuras propician además la entrada de otros patógenos, contaminantes ambientales, agroquímicos, metales pesados, fármacos, entre otras sustancias que se adquieren por contacto, respiración y por el proceso de ingestión de miel, jarabe, azúcar, polen y agua (Verde, 2013).

#### **4.9 Características de la abeja melipona (*Melipona beecheii*)**

La abeja melipona o abeja de la tierra, es una especie sin aguijón que se encuentra distribuida en algunas regiones del Caribe, Belice, México y América Central. La variedad que se encuentra representada en Cuba es *Melipona beecheii* y a diferencia de *Apis mellifera* es más pequeña, pues su tamaño puede oscilar entre dos milímetros y un poco más de un centímetro. Algunas especies en su apariencia no se asemejan a las abejas típicas. Estas abejas viven en colonias, construyen sus nidos o colmenas en cavidades naturales, usualmente en el suelo o en huecos en los troncos de árboles. Aunque carecen de aguijón, cuando son agredidas se lanzan en grupos contra los intrusos (Fonte, 2007).

Las principales características de las meliponas son: Cuerpo robusto con abundante pubescencia que oculta el integumento en el escudo, alas cortas que no sobrepasan el ápice del metasoma, líneas amarillas fuertes en los tergos metasomales, mechones de pelos rojizos y muy densos en los ángulos antero-laterales del escudo, en contraste con el resto de la pubescencia, más clara. En una colonia puede haber entre 10 mil y 15 mil obreras, además de los machos y de las reinas, que pueden ser varias en esta especie, según la cantidad de obreras. Su cera es negra, gruesa, blanda y se le llama Cera virgen o Lacre de Colmena (Fonte, 2007).

Dentro de los productos que esta abeja produce se encuentra la miel, polen, cera, propóleos, además de su valioso servicio como polinizadoras de cultivos tales como: ajonjolote, aguacate, café, calabaza, chayote, chile habanero, mango, pepino, sandía, tomate, entre otros. Una colmena de melipona produce litro y medio de miel al año,

por lo que su proceso de producción es más tardado en comparación con el de las abejas europeas que producen hasta 30 litros de miel en un año. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018).

Entre las diversas peculiaridades de la miel de las abejas meliponas, destacan su mayor acidez y contenido de agua, así como la forma de almacenar la miel en sus nidos, pues después de colectada y deshidratada es depositada en potes de cerumen contruidos con una mezcla de cera y resina vegetal, los que además de conservarla influyen en su sabor y color. Estos factores, le confieren a la miel de estas abejas características suficientes para tratarse por los investigadores y órganos reguladores como un producto diferente que necesita ser caracterizado para su comercialización (Venturieri, *et al.*, 2007, Fernández *et al.*, 2018).

A pesar de que la producción de miel es menor, esta es mucho más beneficiosa que la miel de otras abejas, ya que sus propiedades medicinales ayudan al sistema inmunológico, además de utilizarse para curar dolencias, heridas, quemaduras y enfermedades. En la rama cosmética también es muy utilizada para crear productos como jabones, cremas y talcos (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018)

El polen de las abejas meliponas tiene un valor proteínico 50% mayor que el resto de las abejas. Por otra parte, se sabe el uso de abejas sin aguijón como polinizadoras de los siguientes cultivos: achiote, aguacate, café, calabaza, chayote, chile habanero, mango, pepino, sandía, tomate, entre otros. (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2018).

#### **4.10 Comunidad microbiana intestinal de la abeja de la tierra**

No existe prácticamente información de la microbiota presente en el tracto digestivo de estas abejas, sin embargo, se conoce que estas son más resistentes a las enfermedades que *Apis mellifera*, por lo que esta temática es un campo de la ciencia aún no explorado de gran importancia para el descubrimiento de nuevas especies o sustancias con potencial práctico en la biotecnología.

#### **4.11 Uso de los insectos en la biotecnología**

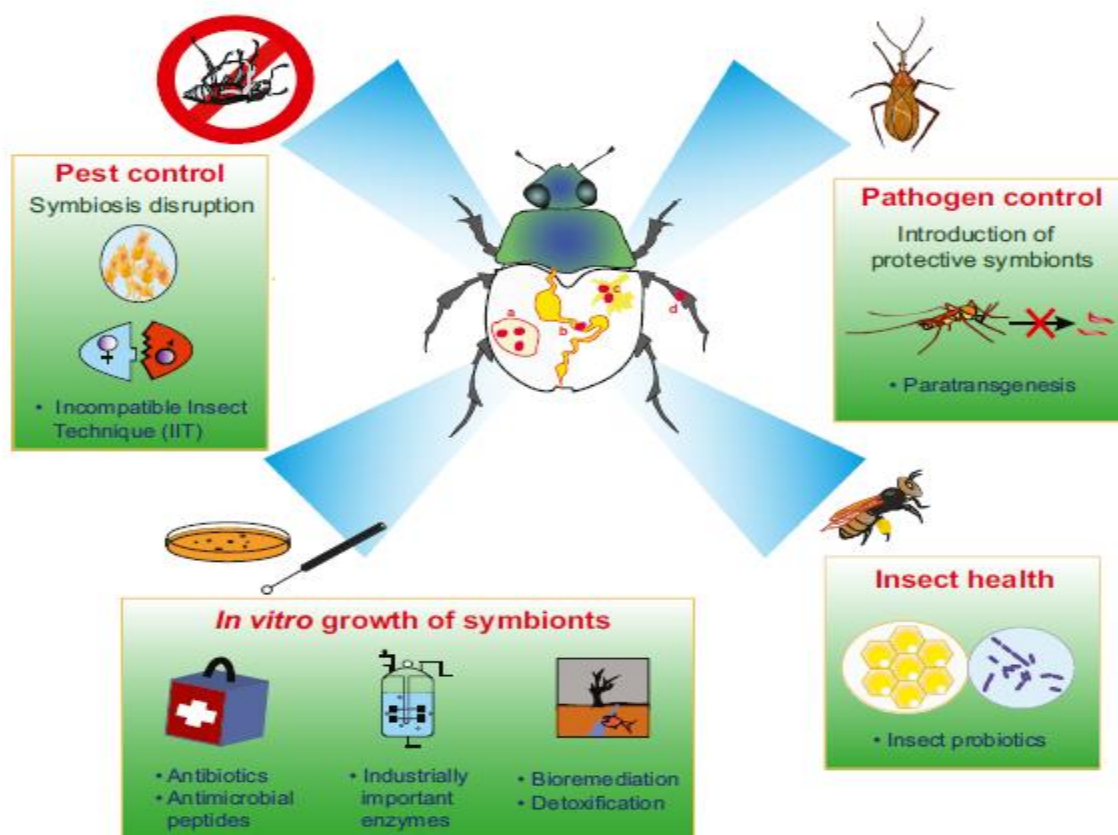
Los insectos establecen con los microorganismos diferentes relaciones simbióticas y pueden llegar a establecer interacciones mutualistas o parásitas. Estas asociaciones están basadas en los servicios nutritivos o defensivos que se suministran por los simbioses a sus anfitriones. En estas interacciones los microorganismos protegen a su hospedero contra agentes patógenos, parásitos o predadores y a menudo producen compuestos antimicrobianos o toxinas (Flórez *et al.*, 2015).

Se conoce que en la naturaleza se establecen interacciones simbióticas entre insectos y microorganismos, y a menudo estas relaciones son la fuente de innovaciones ecológicas. Además de complementar al anfitrión con nutrientes esenciales, los simbioses microbianos pueden producir enzimas que degradan los alimentos en moléculas pequeñas, sustancias que los defienden de agentes patógenos, parásitos y predadores, de ahí que el estudio de la ecología de los insectos y las simbiosis que establecen, representa una fuente importante de compuestos químicos y enzimas con potencial valor biotecnológico. Se plantea que estos conocimientos sobre la simbiosis de estos organismos pueden proveer caminos nuevos para el control de insectos de plagas agrícolas y vectores de los seres humanos (Berasategui *et al.*, 2016).

Los metabolitos secundarios antimicrobianos tienen aplicaciones importantes en la medicina humana y en la agricultura. Sin embargo, el aumento de la resistencia de agentes patógenos de los humanos y el reducido descubrimiento de nuevos compuestos, se plantean como problemas importantes que amenazan con la reaparición de enfermedades humanas. En este contexto, los microorganismos asociados a los insectos constituyen una fuente prometedora de compuestos bioactivos que están comenzándose a descubrir y a explotarse (Dettner, 2011).

En la figura 7 se presenta un esquema que representa el uso de la relación de microorganismos-insectos en la biotecnología. Actualmente se emplea esta

interacción para la obtención de biocontroladores de plagas y para la producción de diferentes sustancias como: antibióticos y péptidos antimicrobianos, enzimas de importancia industrial y para la obtención de cultivos para la biorremediación y la detoxificación de diferentes ambientes (suelo y agua). También se plantea la utilización biotecnológica de microorganismos simbiotes de los insectos como probióticos.

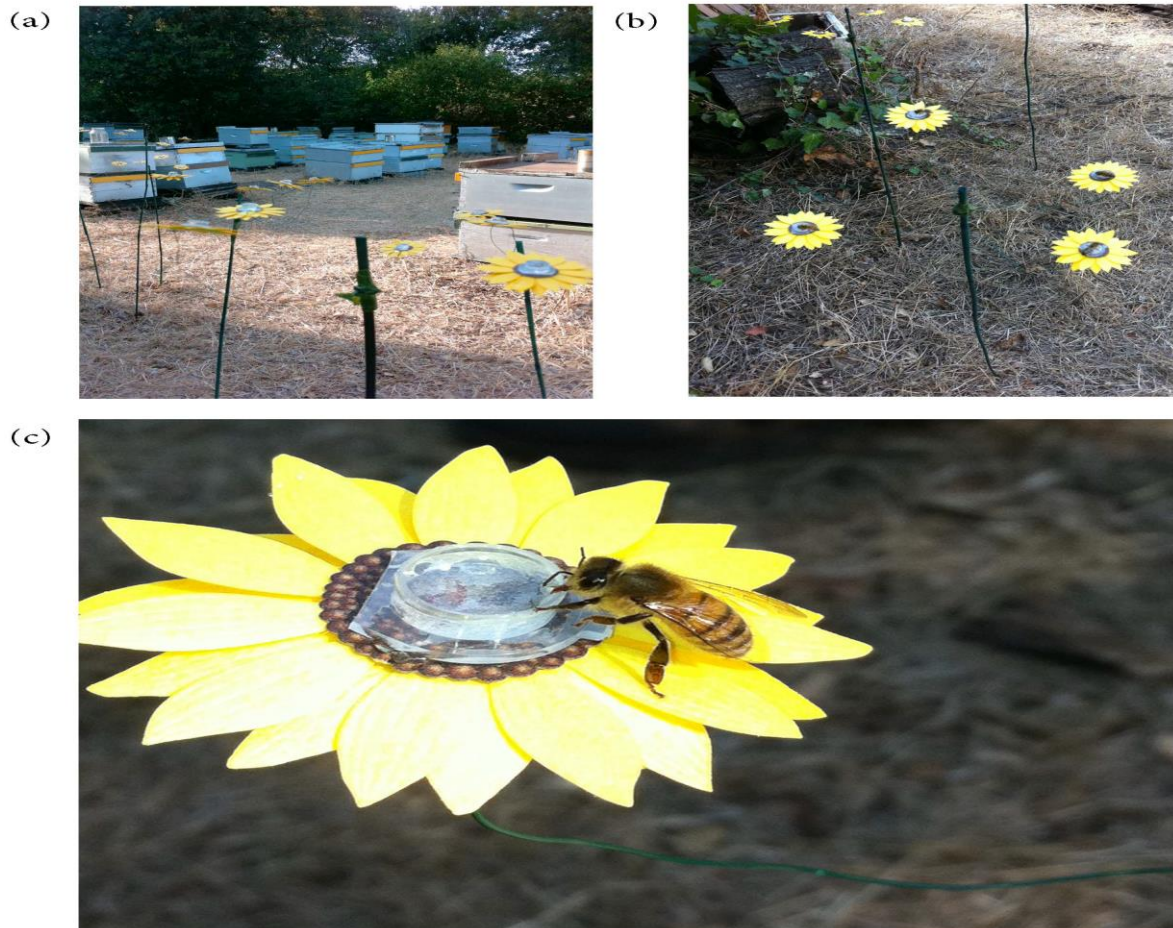


**Figura 7.** Apuntes de la relación simbiótica de microorganismos-insectos con uso potencial en la biotecnología (Berasategui *et al.*, 2016).

#### 4.12 Métodos empleados para la evaluación del efecto de microorganismos probióticos en abejas

Dentro de los métodos empleados para evaluar el efecto de microorganismos en las abejas se encuentra el descrito por Good *et al.* (2014), cuando utilizaron flores

artificiales y colocaron en ellas néctar sintético inoculado con bacterias y levaduras. En la figura 8 se presentan imágenes de este experimento donde se observa el diseño y la disposición del apiario. A través de este método se puede conocer si los microorganismos inoculados provocan cambios químicos en el néctar que impidan que las abejas los seleccionen para su alimentación.



**Figura 8.** Apiario experimental y colocación de las flores artificiales (a) Apiario con flores artificiales organizado en la sombra con 1 - 2 metros entre colmenas. (B) postura de las flores experimentales que contienen néctar sintético inoculado con microbios de las abejas melíferas (C) flor experimental que muestra una abeja melífera alimentándose de néctar sintético (Tomado de Good *et al.*, 2014).

## **4.13 Probióticos y su uso en las abejas melíferas**

### **4.13.1 Concepto de probióticos**

La palabra probióticos proviene del griego: “pro “y “bios” que significa “a favor de la vida”. Se denomina probióticos a un monocultivo o un cultivo mixto vivo de microorganismos, cuya administración ejerce algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido (Klaenhammer y Kullen, 1999).

### **4.13.2 Principales microorganismos utilizados como probióticos en las abejas. Criterios de selección de los microorganismos con potencial probióticos en las abejas**

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

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

Hay innumerables referencias actualmente dedicadas a la selección y caracterización de nuevas especies y cepas más específicas de bacterias probióticas. En general, estos estudios adoptan los criterios de selección básicos establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluida la resistencia al estrés asociado con el huésped, 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 *et al.*, 2018).

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

- Debe ser resistente a las altas concentraciones de azúcares
- Tener una alta capacidad de crecimiento en el medio
- Producir sustancias antimicrobianas frente a los patógenos de las abejas
- Crecer a diferentes pH
- Estimular el sistema inmunológico de las abejas
- Incrementar la digestibilidad de los nutrientes o accionar como suplemento nutricional
- Mejorar la salud y la producción de miel
- Ser inocuo para las larvas o abejas adultas y no provocar toxicidad

#### **4.13.3 Efectos de aplicación de probióticos en *Apis mellífera***

Las abejas, como los seres humanos, otros animales y las plantas, se enferman. Es interesante observar que las enfermedades más peligrosas para las abejas y que pueden llevar a la muerte de la colonia, las afecta en su estado de larva (en las primeras etapas de la vida de una abeja), cuando la composición de su microbiota intestinal está incompleta (Audisio, 2017).

Una posible solución natural al problema consistiría en completar la maduración de la microbiota intestinal de la larva o fortalecerla con la administración de microorganismos “beneficiosos” como las bacterias lácticas o algunas cepas de *Bacillus*. En este sentido Audisio y Benítez-Ahrendts (2011) 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.

Agregar probióticos a los alimentos de las abejas ayuda a que sean más resistentes a la nosemosis, una infección por hongos asociada con el trastorno del colapso de

las colonias. Los probióticos pueden disminuir la tasa de mortalidad de esta infección en las abejas hasta en un 40% (Science, 2018).

Se ha visto que microorganismos aislados de la colmena son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de patógenos como *P. larvae* o *Ascosphaera apis*. En general, se trata de bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Sphingomonas* (Sabate *et al.*, 2009; Yoshiyama y Kimura, 2009; Yoshimaya *et al.*, 2013).

Se plantea que una de las especies dominantes en el tracto digestivo de abejas melíferas es *Lactobacillus kunkeei* (Anderson *et al.*, 2013; Vojvodic *et al.*, 2013; Olmos *et al.*, 2014). 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 y el hombre (Butler *et al.*, 2014). Adicionalmente se comprobó que la morbilidad de las larvas de abejas infectadas por patógenos disminuía cuando estas se suplementaban con un coctel de *Lactobacillus kunkeei* y otras bacterias productoras de ácido láctico (Vasquez *et al.*, 2012).

Alfaro (2013) informó que una especie de *Lactobacillus*, aislada del tracto digestivo de abejas se empleó como probiótico en estos insectos y como resultado se obtuvo la inhibición de la bacteria *Paenibacillus larvae* y hongos como *Ascosphaera*. También observaron un aumento la población de abejas y las adultas vivieron más tiempo, por lo tanto aumentaron los rendimientos de miel en las colmenas hasta en un 20%. Por su parte Augustinos *et al.* (2015) comprobaron que la aplicación de probióticos como *Enterobacter* sp. propició un rápido desarrollo del ciclo de vida de estos insectos

Ptaszyńska *et al.* (2016) desarrollaron un experimento para determinar el efecto antimicrobiano *in vivo* de la aplicación de un simbiótico (probiótico + prebiótico) comercial a base de *Lactobacillus rannhosus* e inulina frente a la infección de



*Nosema ceranae*. Sorpresivamente estos autores demostraron que las abejas alimentadas con estos biopreparados fueron más susceptibles a la infección por este hongo y el tiempo de vida resultó más corto en relación al grupo control. El número de esporas de *N. ceranae* en abejas alimentadas por 9 días con el probiótico comercial fue 25 veces más alto (970 millones de esporas por abeja) que en el grupo control (38 millones de esporas por abeja). En conclusión, la suplementación de la dieta de las abejas con probióticos o prebióticos no seleccionados apropiadamente puede no prevenir la nosemosis, desequilibrar el sistema inmune de los insectos e incluso provocar el aumento de la mortalidad de las abejas. De ahí la importancia de la correcta selección de estos microorganismos para la reducción de los patógenos en las colmenas.

No solo las BAL se emplean como probióticos, también cepas del género *Bacillus* spp. pueden ser utilizadas para prevenir o controlar a los microorganismos patógenos. Evans y Armstrong (2006) detectaron que diez cepas de *Bacillus* spp inhibieron a *P. larvae*, ocho eran del grupo de *Bacillus cereus* y dos eran *B. fusiformis*. En este sentido Wu *et al.* (2014) observaron que cepas de este género mostraron actividad inhibitoria frente a *Melissococcus plutonius*, agente causal de enfermedades en *Apis cerana japonica*.

De acuerdo con Fuenmayor *et al.* (2011), el polen recolectado por abejas es un producto de gran interés nutricional por la concentración de diferentes componentes relevantes en la dieta humana. Sin embargo, estudios previos demuestran las limitantes del sistema digestivo de los monogástricos para el aprovechamiento de algunos de estos nutrientes, debido a la resistente microestructura que recubre los granos de polen. Estos autores demostraron que es posible inducir una fermentación láctica en fase sólida en una matriz conformada por polen apícola, con un inóculo del microorganismo *Lactobacillus acidophilus* por medio de una incubación a 35 °C para la obtención de un producto probiótico y con características funcionales adicionales, el que puede emplearse como suplemento dietario proteico

apto para el consumo humano o como ingrediente en la fabricación de otros alimentos.

Baffoni *et al.* (2016) sugieren que la suplementación de la dieta de las abejas con cepas de bifidobacterias y lactobacilos, los cuales secretan antibióticos, provocan la reducción de los niveles de esporas de *N. ceranae*. Se demostró que otras cepas bacterianas y probióticos (*Parasaccharibacter apium*, *Bacillus* spp., Bactocell® y Levucell SB) mejoran la supervivencia de las abejas infectadas pero no disminuyen las cargas de esporas (El Khoury *et al.*, 2018).

*Objetivos*

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico, obtenido a partir de la microbiota del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B., frente a microorganismos patógenos de *Apis mellifera* L.

### Objetivos específicos

1. Obtener cepas de bacterias ácido lácticas, *Bacillus* spp. y levaduras con potencial probiótico, a partir del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B.
2. Optimizar un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de las cepas candidatas a probióticas.
3. Evaluar a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en larvas desafiadas con *Paenibacillus larvae* y *Nosema ceranae*.
4. Determinar in vivo el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en abejas adultas desafiadas con *Paenibacillus larvae* y *Nosema ceranae*.

*Resultados Esperados*

## 6. RESULTADOS ESPERADOS

- ∞ Obtención de un biopreparado probiótico a partir de microorganismos aislados del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B., para mejorar la salud de *Apis mellifera* L.
- ∞ Desarrollo de una nueva metodología para la obtención, aplicación y evaluación de un biopreparado probiótico en *Apis mellifera* L. con microorganismos procedentes del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B.
- ∞ Diseño y optimización de nuevos medios de cultivo con componentes naturales para el crecimiento de los microorganismos probióticos.
- ∞ Reducción de la infección de *P. larvae* y *N. ceranae* en colmenas de *Apis mellifera* L. y estimulación del sistema inmune de las abejas a partir de la aplicación del biopreparado probiótico.
- ∞ Contribución al desarrollo de trabajos de diplomas para la formación de nuevos ingenieros.
- ∞ Los resultados de este proyecto aportarán publicaciones en revistas de alto impacto.
- ∞ Presentación en eventos y jornadas científicas de la facultad.
- ∞ Capacitación de los trabajadores involucrados en la aplicación de los productos obtenidos en los apiarios de la provincia.

# *Métodos y Procedimientos*

## 7. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS: CRONOGRAMA

El proyecto se desarrollará en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas.

### 7.1. 1<sup>era</sup> etapa: Revisión del Estado del arte

En esta etapa se conformará el equipo que trabajará en el futuro proyecto, con experiencia en la temática. Para su elaboración se tendrán en cuenta los investigadores del CEBIO que poseen experiencia en la temática, los profesores investigadores del Departamento de Carrera que están vinculados con la asignatura de Apicultura, así como, los estudiantes que pertenecen al Grupo científico estudiantil del Grupo de Aditivos Nutricionales del CEBIO.

Labores a desarrollar en esta etapa.

Revisión de bibliografía actualizada del tema

- Historia y desarrollo de la apicultura en Cuba
- Características generales de *Apis mellifera*
- Importancia de la abeja mellifera en Cuba
- Patógenos que afectan a la abeja mellifera en Cuba
- Barreras naturales que protegen a *Apis mellifera* de las enfermedades.  
Síntoma inmune de las abejas
- Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena
- Características generales de *Mellipona beecheii*
- Comunidad microbiana intestinal de la abeja de la tierra
- Probióticos y su uso en abejas melíferas



**7.2. 2<sup>da</sup> Etapa: Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, *Bacillus* spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B.**

**7.2.2. Etapa 2.1 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, *Bacillus* spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B.**

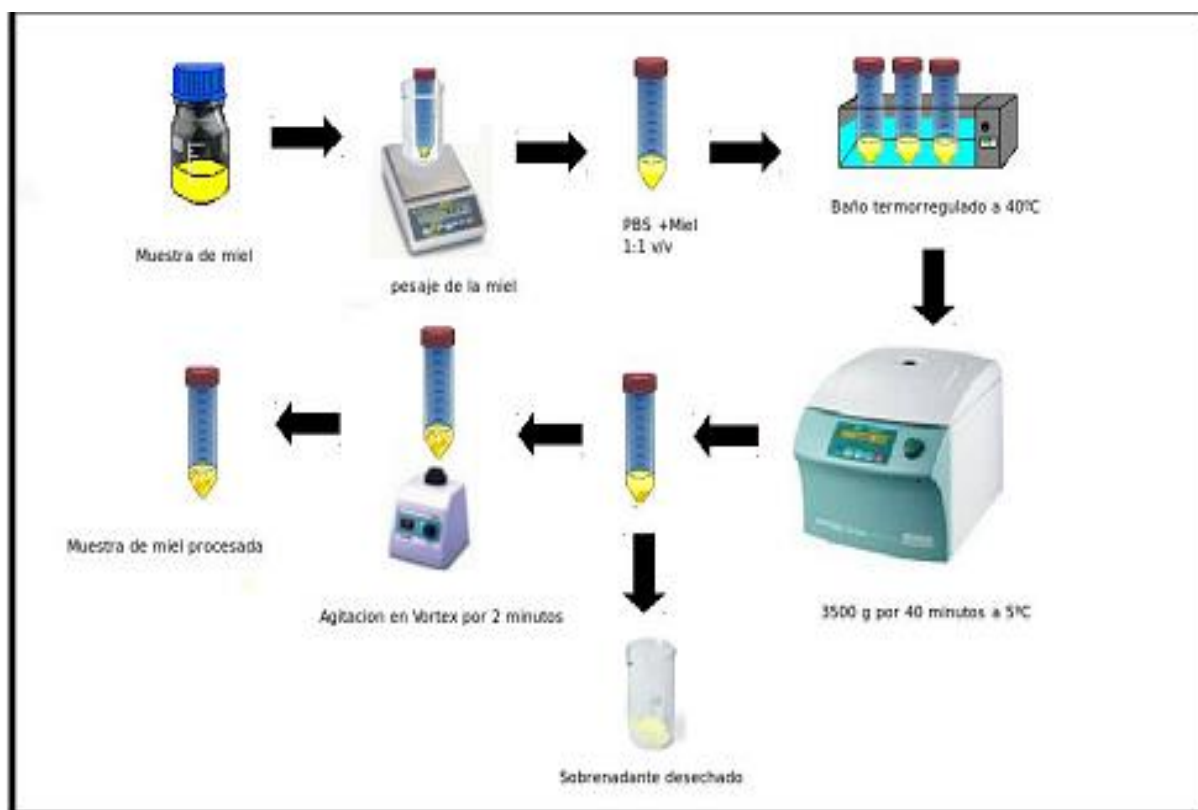
Se colectarán abejas vivas de colmenas sanas pertenecientes a diferentes apiarios de la provincia de Matanzas. Se extraerán asépticamente los intestinos de las abejas y se homogenizarán en 1 mL de solución tampón salina fosfatada (PBS) estéril (NaCl 8,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,41 g por litro de agua destilada). Se realizarán ocho diluciones seriadas y cada dilución se sembrará en placas con agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Alemania), agar nutriente y agar rosa de bengala (rosa de bengala 0,05 % y cloranfenicol 0,5 %) para el crecimiento de *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. y levaduras respectivamente.

Las placas se incubarán a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia para el caso del agar MRS y en condiciones aeróbicas para agar nutriente y rosa de bengala. Posteriormente se seleccionarán aquellas colonias con morfología diferente. Una vez obtenidos los cultivos puros de cada aislamiento, las BAL se conservarán en agar tioglicolato suplementado con carbonato de calcio, *Bacillus* en agar nutriente y las levaduras en agar sabouraud, las cuales se mantendrán en refrigeración a 4°C.

En primera instancia los aislamientos se clasificarán de acuerdo a la morfología de la colonia, tinción de Gram y análisis microscópico. Posteriormente se realizarán las reacciones de catalasa y oxidasa (Gerhardt *et al.*, 1994). La prueba de la catalasa se determinará al colocar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un portaobjetos conjuntamente con una porción de la colonia tomada de un cultivo fresco. La reacción de oxidasa se determinará a través de discos *Bio- Rad*<sup>®</sup> según las instrucciones del fabricante.

### 7.2.3. Etapa 2.2 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, *Bacillus spp* y levaduras con potencial probiótico de la miel de *Melipona beecheii* B.

Se pesarán 5 g de miel en una balanza electrónica, en tubos Falcon de 50 mL, estériles. Posteriormente, se homogeneizarán con 5 mL de buffer fosfato salino (1:1 v/v), 0,01 M, pH 7,2 (PBS) en un baño termostático a  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Los tubos Falcon con la muestra ya homogeneizada con PBS se centrifugarán a 3500 g durante 40 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$  con el objetivo de concentrar las esporas bacterianas en el sedimento. Después de centrifugar las muestras, la mayor parte del sobrenadante se desechará dejando solo aproximadamente 3 mL de este, el cual se mezclará con el sedimento en el vortex, durante 2 minutos (Alippi y Reynaldi, 2006) (Figura 9).



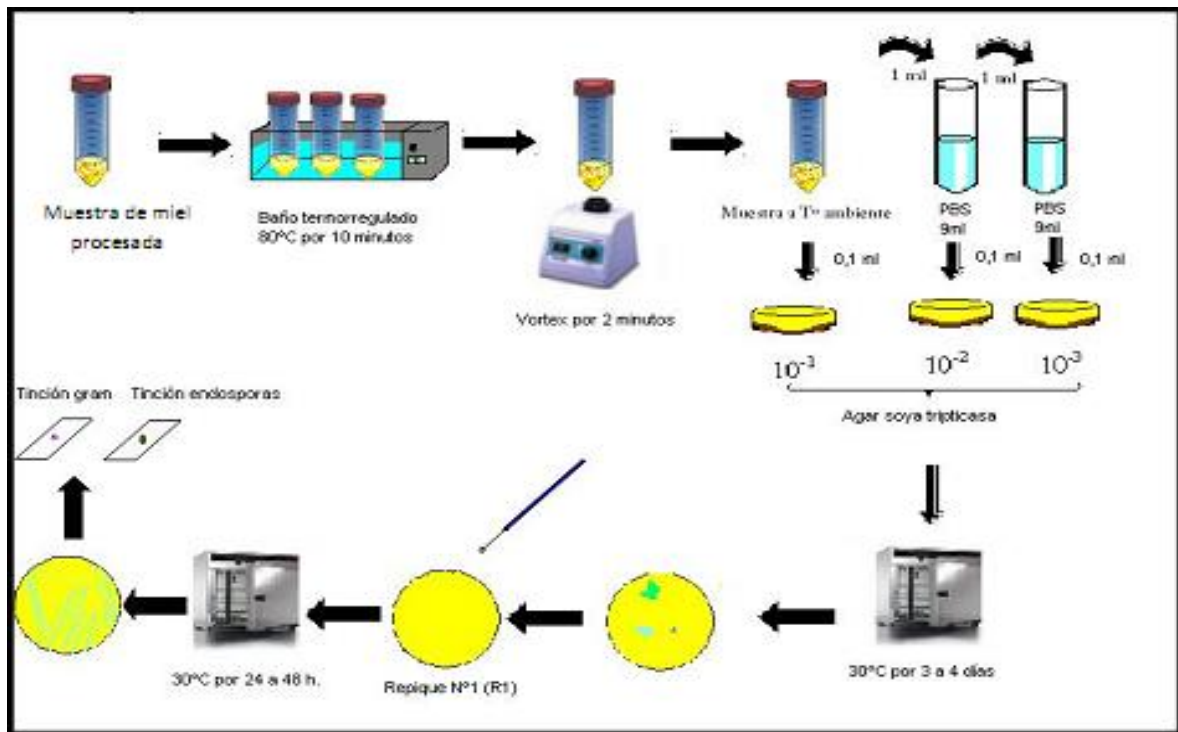
**Figura 9.** Protocolo del procesamiento de las muestras de miel (Tomado de Sandoval, 2010).

Para el aislamiento de las BAL y levaduras, se tomarán muestras de la miel procesada, a las cuales se les realizarán diluciones seriadas y la siembra de 100  $\mu\text{L}$

en placas con agar MRS y agar rosa de bengala. Estas se incubarán a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia y aerobiosis respectivamente.

Para el aislamiento de *Bacillus* spp. se seguirá el procedimiento descrito por Sandoval (2010), el cual se aprecia en la figura 10. Una vez que las muestras de miel se procesen mediante el método descrito anteriormente, se calentarán a  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos en un baño termostático. Las muestras se enfriarán en un vaso precipitado con agua destilada fría y se mezclarán a velocidad alta en un vortex durante 2 minutos. Para facilitar la obtención de las cepas aisladas y puras en las placas, se realizarán dos diluciones decimales en buffer PBS. Se sembrarán 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución sobre placas con agar soya tripticasa, las cuales se incubarán a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  en condiciones aeróbicas durante tres a cuatro días (Alippi y Reynaldi, 2006).

Luego las colonias visualmente aisladas y distintas de BAL, *Bacillus* spp. y levaduras serán inoculadas en otras placas con el mismo medio de cultivo selectivo e incubadas por 24 a 48 h a 37°C en las condiciones de aerobiosis específica para cada grupo. Transcurrido el tiempo de incubación a las colonias desarrolladas en las placas se les hará tinción Gram para establecer su morfología, además, se les realizará tinción con verde malaquita (7%) para observar la presencia de esporas y ver la ubicación de estas en la célula (Harrigan y McCance, 1968).



**Figura 10.** Protocolo de aislamiento de cepas de *Bacillus* a partir de la miel (tomado de Sandoval, 2010).

#### 7.2.4. Etapa 2.3 Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.

##### 1- Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a *Paenibacillus larvae* y *Nosema ceranae*

##### Caracterización *in vitro* del potencial probiótico de los aislamientos. Ensayos de inhibición de *P. larvae*

En este trabajo se utilizará el aislamiento bacteriano *P. larvae* procedente del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spiritus, Cuba. Para estudiar la capacidad antimicrobiana de los aislamientos obtenidos a partir del intestino de abejas melíferas frente a *P. larvae*, se utilizarán tres técnicas: el método de difusión de sustancias en agar (Schillinger y Lucke, 1989), los cocultivos (Orlowski y Bielecka, 2006) y el método de coagregación (Orlowski y Bielecka, 2006).

- Método de difusión de sustancias en agar (Schillinger y Lucke, 1989). Desarrollo de la técnica de difusión en agar: Se tomarán 200  $\mu\text{L}$  del cultivo de las cepas indicadoras en estudio, que estaban en la escala 0,5 de MacFarland y se inocularán en tubos de ensayos con 20 mL de agar J. Luego de su homogenización, se verterá en placas Petri (por triplicado) para su solidificación. Con ayuda de un sacabocado metálico estéril, se abrirán pocillos de 5 mm de diámetro donde se añadirán 60  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes de cada una de las variantes en estudio. Dichas placas se mantendrán en refrigeración (4°C) por 4 horas para mayor difusión de las sustancias en el agar. Posteriormente, las placas se incubarán entre 24 y 48 horas a 37°C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos. Por último, se medirá el halo con regla milimetrada y se le restará el diámetro de los pocillos.
- Cocultivos. Se utilizará la técnica descrita por Orłowski y Bielecka (2006), modificada por los autores del presente proyecto. El desarrollo del cocultivo se realizará en caldo J modificado, medio de cultivo que simulará el contenido gastrointestinal de las abejas. Este se adicionará en frascos de 100 mL, a razón de 50 mL de volumen efectivo. En cada frasco se añadirá 1 mL del cultivo candidato a probiótico y 1 mL del cultivo del microorganismo patógeno o indicador (con una población de  $10^3 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Una vez mezclados, los cocultivos se incubarán en condiciones estáticas durante 12 h a 37°C y se tomarán muestras a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h para realizar diluciones seriadas en caldo peptona (1%). El conteo de viables se realizará en placas que contengan medios selectivos para *Paenibacillus larvae*.
- Coagregación (Orłowski y Bielecka, 2006). La determinación de la coagregación de células de cepas patógenas a los componentes de pared celular de las bacterias aisladas se realizará mediante la preparación de suspensiones celulares. Para ello se realizará el cultivo de las cepas patógenas en caldo J por 24 h a 37°C. Por otra parte se cultivarán las cepas aisladas en los medios específicos. Posteriormente, se mezclarán 2 mL de cada cultivo. Volúmenes iguales (2 mL) de cada suspensión

celular (cepas aisladas + patógeno) se mezclarán y al mismo tiempo se tomarán muestras de los cultivos puros en caldo J. Una vez inoculados los cultivos puros, se procederá a determinar la absorbancia (A) a 600 nm antes y después de 5 horas de mezclados e incubados a temperatura ambiente. El porcentaje de coagregación se determinará a través de la siguiente fórmula (Orłowski y Bielecka 2006):

$$\% \text{ de Coagregación} = \left[ \frac{(A_{xt} + A_{yt})/2 - A_t (x + y)}{(A_{xi} + A_{yi})/2} \right] \cdot 100$$

A<sub>xt</sub>: Absorbancia a las 5 h de la cepa patógena.

A<sub>yt</sub>: Absorbancia a las 5 h de cepas seleccionadas.

A<sub>t (x + y)</sub>: Absorbancia de la mezcla de la cepa patógena + cepas seleccionadas.

A<sub>xi</sub>: Absorbancia de la cepa patógena en el tiempo inicial.

A<sub>yi</sub>: Absorbancia de cepas seleccionadas en el tiempo inicial.

**Tolerancia a diferentes condiciones de acidez** (Arredondo, 2015). Para estimar la supervivencia bacteriana bajo diferentes condiciones de acidez se realizará una modificación del método descrito por Jacobsen *et al.* (1999). Se prepararán suspensiones en PBS de los aislamientos con 24 h de incubación a 37°C. La turbidez de las suspensiones se igualarán con el estándar 0,5 de la escala Mc Farland y se emplearán 20 µL de las mismas para inocular placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos conteniendo 180 µL de caldo nutriente (*Bacillus* y levaduras) o caldo MRS (BAL) a tres pH diferentes: 3, 5 y 7 (modificados con HCl o NaOH). Las placas se incubarán a 37°C, se realizaron medidas cada 30 min durante 4 h y una medida final a las 24 h. Se realizará el recuento de las células viables mediante siembra en los medios específicos a las 0 y 4 h. Las placas se incubarán a 37°C durante 24-48 h en condiciones aerobias y de microaerofilia según el microorganismo a estudiar. Este ensayo se realizará por triplicado para cada aislamiento.

**Resistencia osmótica al jarabe** (Antunez *et al.*, 2015). Se prepararán suspensiones de los aislamientos obtenidos en PBS, a partir de cultivos en agar MRS y agar nutriente a 37°C durante 24 h. La turbidez de las suspensiones se igualará con el estándar 4 de la escala Mc Farland (DO<sub>600</sub> = 0,669, 1x10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>). Paralelamente, se preparará un jarabe en concentraciones de 1000 o 2000 g de azúcar por litro de agua (1:1 y 2:1 respectivamente), utilizadas habitualmente por

los apicultores en el campo. A partir de las suspensiones originales de los aislamientos en PBS se realizarán dos suspensiones bacterianas en jarabe 1:1 y 2:1 a una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> y se incubarán a 37°C durante 72 h. El número de células bacterianas viables en cada tratamiento se determinará por recuento en placa en agar MRS (BAL) y agar nutriente (*Bacillus* y levaduras) a las 0 y 72 h. Las placas se incubarán a 37°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia y aerobiosis según el microorganismo.

**Capacidad de crecimiento** (Harrigan y McCance, 1968). A partir de cultivos frescos a 37°C durante 24h en caldo MRS y nutriente de los diferentes aislamientos, se prepararán diluciones en el mismo medio con una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala McFarland ( $OD_{600} = 0,132$ ,  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml), y se emplearán 20µl de las mismas para inocular placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos, conteniendo 180µl de caldo MRS o caldo nutriente. Las placas se incubarán a 37°C, realizándose medidas de absorbancia a 600 nm en el tiempo inicial y sucesivamente cada dos horas hasta las 12h, y una medida final a las 24h. Estas medidas de absorbancia se utilizarán para evaluar el tiempo de generación de los aislamientos. El ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

**Producción de ácido láctico** (Santos *et al*, 2016). La producción de ácido láctico por BAL se determinó por una titulación ácido-base, según Santos y col. (2016). Los lactobacilos se cultivarán en 10 mL de caldo MRS por 18 h a una temperatura de 37°C en tubos con tapas de roscas hasta que alcancen una absorbancia de 0,9 (109 UFC.mL<sup>-1</sup>). Posteriormente, se diluye una alícuota de 1 mL de los sobrenadantes de los cultivos en 9 mL de agua destilada estéril y se homogeneizarán. Esta mezcla (10 mL) se titulará con NaOH 1M y se utilizará como indicador la fenolftaleína. Las cantidades de ácidos orgánicos equivalentes están dadas por el consumo de NaOH 1M en mL. Cada mL de NaOH 1M equivale a 90,08 mg de ácido láctico. Se utilizará como control la cepa C65 de *Lactobacillus salivarius* y los resultados se expresarán en g.L<sup>-1</sup>.

**Seguridad de su administración en larvas** (Antunez *et al.*, 2015). Se realizará un ensayo para determinar la seguridad biológica de las cepas seleccionadas. Para

ello se tomarán un total de 50 larvas para cada tratamiento con los candidatos a probióticos y un grupo control. Se aplicará una dosis elevada ( $10^{12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) en un jarabe (azúcar crudo 100%) a las larvas que se tratarán con las cepas seleccionadas y al control solo se suministrará el jarabe con alta concentración de azúcar. Se evaluará la supervivencia de las larvas, los signos clínicos y los análisis macroscópicos, microscópicos y anatomopatológicos de los órganos con la aplicación de los candidatos a probióticos.

### **Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los microorganismos candidatos a probióticos.**

Dentro de las pruebas a realizar están: prueba de la catalasa, prueba de Voges-Proskauer, crecimiento en anaerobiosis, crecimiento en presencia de un 7% de NaCl, utilización de citrato, hidrólisis del almidón, producción de ácido y gas a partir de glucosa, hidrólisis de la caseína, crecimiento a diferentes pH y temperatura (Harrigan y McCance, 1968).

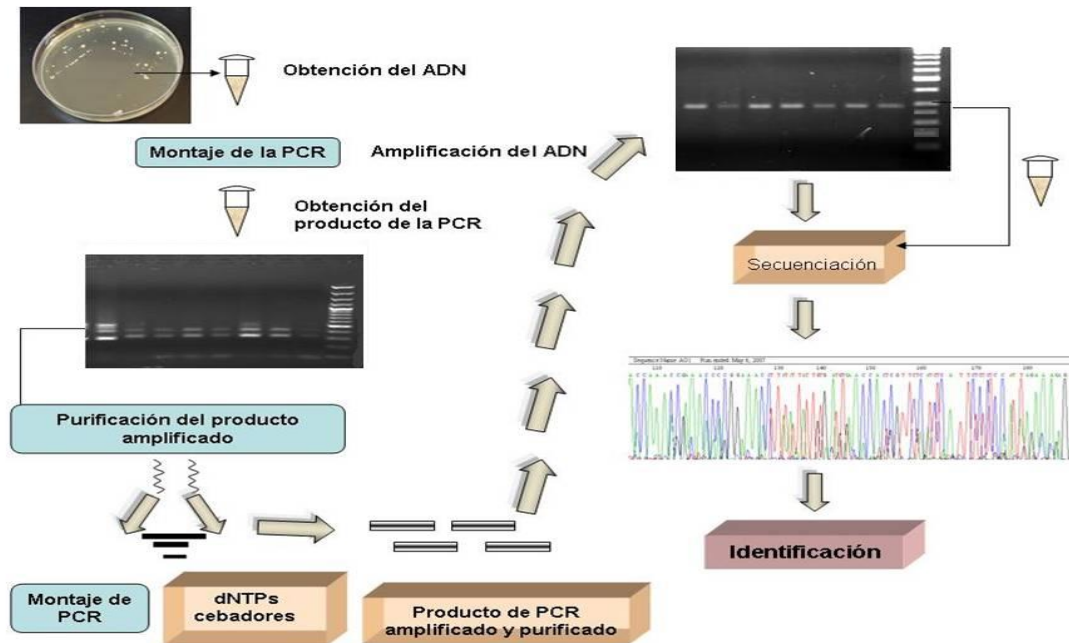
También se realizará la determinación de la capacidad de fermentación de carbohidratos. Para ello se prepararán cultivos de las cepas en caldo MRS (BAL) y caldo nutriente (*Bacillus* y levaduras) y se incubarán a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se centrifugarán y lavarán en solución salina al 0,9 % y a partir de este momento, se seguirá la metodología descrita para las galerías API 50 CH y API 50 CHL Medium (BioMerieux, S. A., Francia) para *Lactobacillus* spp. y API 50CHB/E que se utiliza para la identificación del género *Bacillus* y microorganismos próximos. La identificación de las cepas se realizará mediante la utilización del software Apilab Plus, versión 3.3.3.

### **Identificación por PCR**

Con el objetivo de comprobar la identificación de las cepas se utilizará la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, las cepas se cultivarán por agotamiento en agar MRS y agar nutriente a 37 °C, en condiciones específicas de aerobiosis o anaerobiosis por 48 h. A partir de la obtención de las colonias puras, se



realizará la siguiente secuencia experimental y en la figura 11 se presenta un esquema que resume las diferentes etapas que se desarrollarán.



**Figura 11.** Esquema de los procedimientos para la obtención, amplificación, purificación y secuenciación del ADN.

**7.3. 3<sup>era</sup> Etapa:** Optimización de un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de las cepas candidatas a probióticos.

Se realizarán las diferentes tareas

- Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de las cepas probióticas. Se aplicará el método de superficie de respuesta (Box y col., 1978)
- Estudio de la cinética del crecimiento en el nuevo medio de cultivo. Cálculo de la velocidad de crecimiento y tiempo de generación.
- Estudio de la estabilidad del biopreparado en condiciones de almacenamiento (Duración 180 días).
- Determinación del costo de producción de los biopreparados a escala de laboratorio.

#### **7.4. 4ta Etapa: Evaluación a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en larvas y abejas adultas desafiadas con *Paenibacillus larvae* y *Nosema ceranae*.**

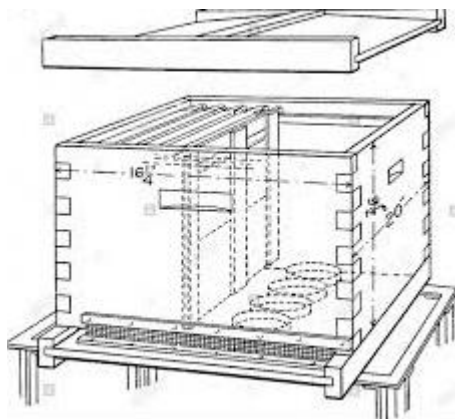
Se realizarán dos experimentos con un diseño completamente aleatorizado que tendrá como tratamientos: Grupo I. Control (jarabe), Grupo II. Desafiadas con *P. larvae* o *N. ceranae* en el jarabe, Grupo III. Con la aplicación del biopreparado probiótico en el jarabe y Grupo IV. Desafiadas con *P. larvae* o *N. ceranae* + biopreparado probiótico obtenido inoculado en el jarabe, en larvas y abejas adultas.

Se evaluarán los indicadores de salud:

Supervivencia de las larvas. El efecto en la supervivencia de los microorganismos probióticos seleccionados, así como su capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos, se evaluará utilizando un modelo de cría e infección de larvas en el laboratorio.

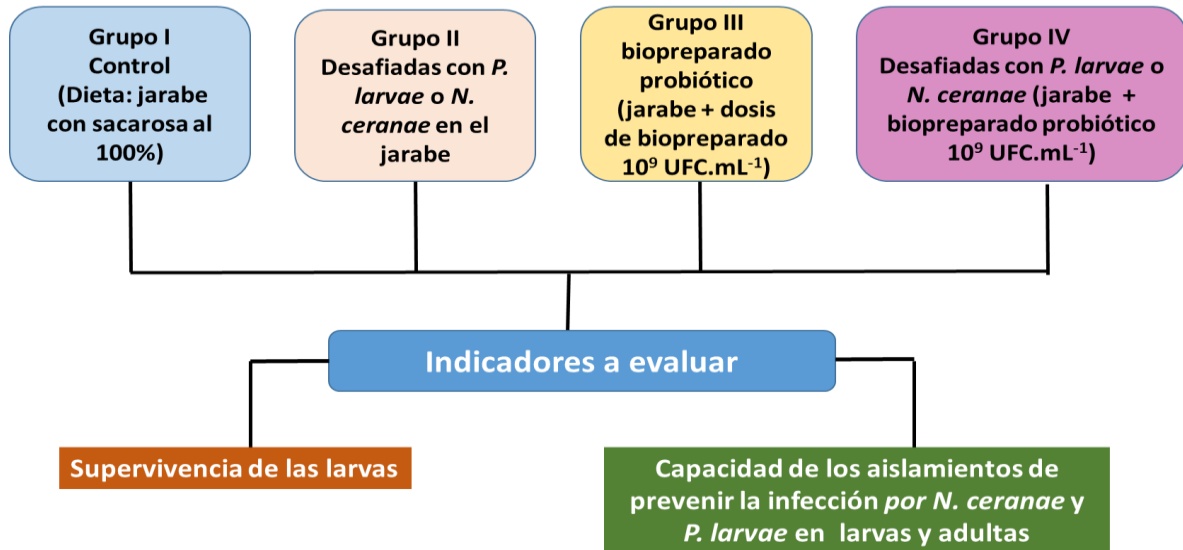
Capacidad de los aislamientos de prevenir la infección por *N. ceranae* y *P. larvae* en larvas y abejas adultas alimentadas con los potenciales probióticos.

En la Figura 12 se presenta un esquema de las cajas que se utilizarán para el desarrollo de los experimentos en abejas adultas.



**Figura 12.** Diseño de las cajas que se emplearán para el desarrollo de los experimentos en abejas adultas.

En la figura 13 se aprecia un esquema que resume cómo se desarrollarán los experimentos.



**Figura 13.** Esquema del desarrollo de los experimentos para el desafío de larvas y abejas adultas con *Paenibacillus larvae* y *Nosema ceranae* y la presencia del biopreparado probiótico.

El desarrollo del cronograma de trabajo se presenta en la tabla 2.

## 7.5.CRONOGRAMA

**Tabla 2.** Cronograma de las principales tareas a ejecutar durante el desarrollo del Proyecto.

Etapas	Tareas	Fechas de inicio	Fecha de culminación
<b>Etapa 1.</b> Revisión del estado del arte	Revisión bibliográfica y elaboración de proyecto	Enero 2020	Julio 2020
<b>Etapa 2.</b> Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo y la miel de <i>Melipona beecheii</i> B.	Etapa 2.1 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico del tracto digestivo de <i>Melipona beecheii</i> B. Etapa 2.2 Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas, <i>Bacillus</i> spp y levaduras con potencial probiótico de la miel de <i>Melipona beecheii</i> B. Etapa 2.3 Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.	Septiembre 2020	Julio 2021
<b>Etapa 3.</b> Optimización de un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de las cepas candidatas a probióticos.	3.1 Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de las cepas probióticas. 3.2 Estudio de la cinética del crecimiento en el nuevo medio de cultivo. 3.3 Estudio de la estabilidad del biopreparado en condiciones de almacenamiento. 3.4 Determinación del costo de producción de los biopreparados a escala de laboratorio.	Enero 2021	Abril 2021
<b>Etapa 4.</b> Evaluación a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en larvas y abejas adultas desafiadas con <i>Paenibacillus larvae</i> y <i>Nosema ceranae</i> .	4.1 Evaluación a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en larvas desafiadas con <i>Paenibacillus larvae</i> y <i>Nosema ceranae</i> . 4.2 valuación a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico en abejas adultas desafiadas con <i>Paenibacillus larvae</i> y <i>Nosema ceranae</i>	Mayo 2021	Diciembre 2021
Procesamiento estadístico de los resultados		Enero 2022	Marzo 2022
Escritura del informe		abril 2022	Julio 2022
Presentación de los resultados		Diciembre 2022	

*Recursos necesarios.*  
*Presupuesto global del Proyecto*

## 8. RECURSOS NECESARIOS Y PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO

En las tabla 3 se presentan los recursos humanos para desarrollar el proyecto.

**Tabla 3.** Recursos humanos principales.

<b>Nombres y apellidos</b>	<b>Jefe de resultado</b>	<b>Grado científico</b>	<b>Categoría docente</b>	<b>Entidad</b>	<b>% de participación</b>
Ana Rondón Castillo	X	Dr.C	Profesor titular	UM	15
Marlene Martínez Mora	X	MsC.	Profesor auxiliar	UM	15
Eduardo Demedio	X	Dr.C.	Profesor titular	UNAH	10
Yasmary Rubio Fontanills			Profesor instructor	UM	10
Grethel Milián Florido		Dr.C	Profesor titular	UM	10
Marlen Rodríguez Oliva		Dr.C	Profesor titular	UM	10
Juan Emilio Hernández		Dr.C.	Profesor titular	Universidad de Sancti Spiritus	10
Especialista de la producción				MINAG	10
Especialista del laboratorio de referencia para la salud de las abejas				MINAG	10

En la tabla 4 se presentan los recursos necesarios para el desarrollo del proyecto, los cuales serán aportados por las instituciones participantes.

**Tabla 4.-** Recursos necesarios que aportan las instituciones involucradas

<b>Recursos necesarios</b>	
<b>Aporte institucional</b>	<b>Materiales</b>
Universidad de Matanzas	Medios de cultivo
	Cristalería y misceláneas
	Agua destilada y corriente
	Balanza digital
	Autoclave
	Refrigerador
	Incubadora
	Flujo laminar
	Zaranda termostatada
	pH digital
	Microscopio óptico
	Erlenmeyer de diferentes capacidades
	Frascos de cristal
Placas petri	
Especialistas de la producción y del Laboratorio de referencia de las abejas (LARISA)	Cepas de referencia. microorganismos patógenos de las abejas
	Abejas para evaluación de biopreparados
	Cajas para las pruebas con las abejas

En las tabla 5 se presenta de forma detallada cómo se calculó el presupuesto global del proyecto.

**Tabla 5.- Presupuesto global del proyecto**

Concepto	Presupuesto Global del Proyecto (en Miles de Pesos)									
	Año		Año		Año		Año		Total	
	MT	CUC	MT	CUC	MT	CUC	MT	CUC	MT	CUC
Salario(1)	2700		2700		2700		2700		10800	
Otras retribuciones (2)										
Salario complementario (9,09 % del salario total anual) (3)	245,43		245,43		245,43		245,43		981,72	
Subtotal (4)	2945,43		2945,43		2945,43		2945,43		11781,72	
Seg. Social (5)	412,36		412,36		412,36		412,36		1649,44	
Impuestos por la utilización de la fuerza de trabajo (6) según lo aprobado para el año.										
Recursos materiales (7)	1500	600	1500	600	1500		1500		6000	1200
Subcontrataciones (8)			2000		2000				4000	
Otros recursos (9)	2600	600	2600	600	2600	600	2600	600	10400	2400
Subtotal (10)	4512	1200	6512,36	1200	6512,36	600	4512,36	600	22049,44	3600
Total Gastos Corrientes Directos (11)	7457,43	1200	9457,79	1200	9457,79	600	7457,43	600	33831,16	3600
Gastos de Capital (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gastos Indirectos (13)	1472,71		1472,71		1472,71		1472,71		5890,84	
Total Gastos (14)	8930,14	1200	10929,71	1200	10929,71	600	8930,14	600	39722,00	3600
Total General del Proyecto	8930,14	1200	10929,71	1200	10929,71	600	8930,14	600	39722,00	3600

Para el cálculo del Presupuesto del proyecto en Moneda Total (MT) se incluyeron los datos que se presentaron en la tabla 5, la cual incluye los gastos previstos en moneda nacional y los gastos correspondientes en CUC.

Salario (1): Presupuesto de salario del personal vinculado directamente al proyecto, de acuerdo con su por ciento de participación. La cifra anual comprende solamente 11 meses pues el mes de vacaciones está considerado en el 9,09% del salario anual.



Otras retribuciones (2): Presupuesto de otros gastos correspondientes a cualquier otro pago al personal directamente vinculado al proyecto y que no constituye salario, como por ejemplo pago de estimulación, pago por participación en proyectos, entre otros.

Salario complementario (3): Presupuesto correspondiente a las vacaciones del personal directamente vinculado al proyecto. Corresponde al 9,09% de la suma de las cifras que aparecen en (1) y (2).

Subtotal (4): Cifra que incluye la suma de (1), (2) y (3): salario, otras retribuciones y salario complementario.

Seguridad social (5): 14% de la cifra subtotal (4)

Impuesto por la utilización de la fuerza de trabajo (6): según el por ciento aprobado en el año. (4)

Recursos materiales (7): Presupuesto vinculado a los gastos previstos para la adquisición de los recursos materiales necesarios para la ejecución del proyecto.

Subcontrataciones (8): Presupuesto para el pago de los servicios o actividades que la entidad ejecutora principal prevé contratar para la ejecución del proyecto.

Otros recursos (9): Presupuesto para todo tipo de recursos y actividades que requieran financiamiento, tales como: investigación del estado de la técnica, vigilancia tecnológica, protección legal de los resultados, aseguramiento de la calidad, gestión ambiental, formación de recursos humanos, publicación de documentos, viajes y dietas, pago de licencias, gastos de celebración de eventos, entre otros.

Sub-total (10): Cifra que incluye la suma de (5), (6), (7), (8) y (9)

Total, de gastos corrientes directos (11): Se calcula sumando los subtotales (4) y (10).

Gastos de capital (12): Presupuesto para los gastos correspondientes a inversiones materiales o compra de activos fijos (equipos y otros) necesarios para el proyecto. Deben estar en correspondencia con el plan de inversiones de la entidad y tienen que cumplimentar los aspectos relacionados con la Política del proceso inversionista.

Gastos Indirectos (13): Son aquellos gastos que no son identificables con el proyecto y se relacionan con él de forma indirecta. La característica de estos gastos está dada por la imposibilidad de asociarlos directamente a un proyecto específico, ya que son gastos que se relacionan con la actividad general de la entidad, por lo que se aplican a cada Centro de Costo (Proyecto) por la vía del prorrateo (Coeficiente de Gastos Indirectos), sobre determinadas bases, como por ejemplo los salarios directos. Como ejemplos más comunes de gastos indirectos a la actividad del Proyecto se pueden citar: gastos de reparaciones generales, mantenimiento, gastos de salario de personal relacionado indirectamente con el proyecto, gastos de electricidad, agua, gas, depreciación de instalaciones o equipos, desgastes de útiles y herramientas, servicios de teléfono, comunicaciones e internet, entre otros.

*Evaluación económico –  
financiera*

## **9. EVALUACIÓN ECONÓMICO – FINANCIERA**

El desarrollo del presente trabajo traerá como beneficio el incremento de la producción apícola, dígase miel, ceras etc ya que de forma directa los biopreparados que se obtengan contribuirán a disminuir la incidencia de enfermedades de las abejas, lo cual se traduce en beneficios a largo plazo en la apicultura.

La ejecución de este proyecto traerá consigo un impacto desde el punto de vista ambiental, ya que si disminuye la pérdida de las colmenas debido a la reducción de los agentes causantes de enfermedades, se incrementará el número de abejas, las cuales tienen como función imprescindible la polinización de las plantas.

Desde el punto de vista económico no se incurrirá en inversiones para el desarrollo del proyecto, ya que se dispondrá de las instalaciones, equipos, de las instituciones participantes, las cuales tendrán a su cargo toda la fase experimental. Se necesitarán recursos financieros para el pago de salarios, viáticos, cuotas de participación en eventos, pago de servicios, publicaciones etc.

## *Bibliografía*

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, L. 2013. Mejoraron la producción de miel con la aplicación de bacterias probióticas. El Tribuno. Edición 7285
- Alippi, A. y Reynaldi, F. 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology* 91:141-146.
- Alippi, A.M., León, I.E., López, A.C. 2014. Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. *International Microbiology* 17:49-61.
- Anderson KE, *et al.* 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8:e83125.
- Anido, M., 2013. Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. PEDECIBA. Uruguay. P 22.
- Anon. 2017. Anatomía digestiva de las abejas. Corona apicultores. Disponible en: <http://coronaapicultura.blogspot.com/2017/03/anatomia-digestiva-de-las-abejas.html>. Fecha de consulta: 4 de abril de 2019.
- Anon. 2018. La importancia de los probióticos en la apicultura. Portal Apícola. Disponible en: [www.antunez.com](http://www.antunez.com)
- 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.
- 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.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C., Martín-Hernández, R., Higes, M., Zunino, P. 2013. Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. INIA Serie de difusión N°41
- Antúnez, K., D' Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P. 2005, Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 90: 69-72.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., 2006, Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 93: 67-70.

- Arredondo, D. 2015. Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.
- Asenjo, F., Olmos, A., Henríquez-Piskulich, P., Polanco, V., Aldea, P., Ugalde, J.A., Trombert, A.N. 2016. Genome sequencing and analysis of the first complete genome of *Lactobacillus kunkeei* strain MP2, an *Apis mellifera* gut isolate. PeerJ 4: 2-21. DOI 10.7717/peerj.1950.
- Audisio, M.C., Sabaté, D.C., Benítez-Ahrendts, M.R. 2015. Effect of *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. Beneficial Microbes 6(5): 687-695. DOI 10.3920/BM2014.0155.
- 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., 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.
- Augustinos, A.A., Kyritsis, G.A., Papadopoulos, N.T., Abd-Alla, A.M.M., Caceres C., Bourtzis, K. (2015). Exploitation of the medfly gut microbiota for the enhancement of sterile insect technique: use of *Enterobacter* sp. in larval diet-based probiotic applications. PLoS One 10. doi:10.1371/journal.pone.0136459.
- Baffoni, L., Gaggia, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B., et al. 2016. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. Benef Microbes 7:45–51.
- Berasategui, A. Shukla, S., Salem, H., Kaltenpoth, M. 2016. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol 100:1567–1577.
- Bogusz, M.; Hassan, H.; Al-Enazi, E.; Ibrahim, Z. y Al-Tufail, M. 2004. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. Journal Chromatography B. 807: 343–356.
- Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz Á, 2012. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies: queen replacement influences *Nosema* infection in honey bee colonies. Environ Microbiol.;14(4):845–59.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G. & Hunter, J.S. 1978. Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building. John Wiley & Sons, New York, USA

- Burnham, A.J. 2019. Scientific Advances in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Front Vet Sci.* 6: 79. Doi: 10.3389/fvets.2019.00079.
- Calatayud, F. Simó, E. 2003. Importancia de las abejas melíferas y otros insectos como agentes polinizadores de las plantas cultivadas y silvestres de la comunidad valenciana
- Cariveau, D.P., Powell, J.E., Koch, H., Winfree, R., Moran, N. 2014. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *International Society for Microbial Ecology* 8: 2369–2379.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. ; Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. *J. Dairy Sci.* 70:1-12
- Corby-Harris, V., A. Snyder, L., Schwan, M.R., Maes, P., McFrederick, Q.S., Anderson, K.E. 2014. Origin and effect of alpha 2.2 acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (24):7460–7472.
- Corby-Harris, V., Maes, P., Anderson, K.E. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* 9(4): 1-13.
- DeGrandi, G., Chen, Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10:170–176.
- Del Hoyo, M.; Basualdo, M.; Torres, J.; Bedascarrasbure, E, L. 1998. Use of DHT-equipment of AFB-contaminated beehive materials in Argentina. *Journal American Bee.* 138 (10):738-740.
- Delgado, C., Álvarez, D., Borges, D.E., Alvero, J.L., Peñate, M. 2016. Impact of the agroclimatic variability on the production of honey in Cuba. *Apiciencia XVIII* (1):29-51.
- Dettner, K. 2011. Potential pharmaceuticals from insects and their co-occurring microorganisms. In: Vilcinskis A (ed) *Insect Biotechnology*, p 95–119.
- Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., Liesegang, H., García-González, E., Genersch, E., Daniel, R. 2014. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE* 9(3): e90914. doi.org/10.1371/journal.pone.0090914.
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, Marc Bonnet, C., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A, Le Conte, Y., Alaux, C. 2012. Gut pathology and responses



- to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honeybee *Apis mellifera*. PLoS ONE 7(5): 1-11.
- El Khoury, S., Rousseau A, Lecoœur A, Cheaib B, Bouzlama S, Mercier PL, *et al.* 2018. Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administrating either endogenous or allochthonous gut microbiota strains. Front Ecol Evol 6:58. Doi. 10.3389/fevo.2018.00058.
- Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N.A. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honeybee. PNAS 109 (27): 11002–11007.
- Evans, J.D., Armstrong, T.N. 2006. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. BMC Ecology 6 (4): 1-9. doi:10.1186/1472-6785-6-4.
- Fei, Ch. 2006. Las defensas naturales de las colonias de *Apis Mellifera* . disponible en <https://ecocolmena.com/las-defensas-naturales-de-las-colonias-de-apis-mellifera/>. Consultado: abril 1, 2019.
- Fernández, N., Navarro, J. M., Martínez, J. A. 2018. Caracterización de la miel de Meliponas en ecosistemas periurbanos y agrícolas del Consejo Popular Horquita. Revista Científica Agroecosistemas 6 (1): 28-33.
- Flórez, L.V., Biedermann, PHW, E. T., Kaltenpoth, M. 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Nat Prod Rep 32:904–936.
- Fries. I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology, 103: 73-79.
- Fuenmayor, C.A., Quicazán, M.C., Figueroa, J. 2011. Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando bacterias ácido lácticas probióticas. Revista Alimentos Hoy 20(23): 18-40.
- Fonte, Leydi. Las "abejas de la tierra" en zonas de las provincias occidentales de Cuba: las colmenas, la miel que producen y los "meliponicultores". Trabajo de diploma. Universidad Agraria de La Habana, Cuba. 77 p. 2007.
- García, D., Rojas, M.A., Sánchez, J. 2006. Cultured microbiological content of the intestinal tract and stored pollen of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).
- Genersch, E, 2006. Reclassification of *Paenicillium larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56,501-511.

- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006, Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subs *P. larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 501-511.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Good, A.P., Gauthier, -Pierre, L.M., Vannette, R.L, Fukami, T. 2014. Honey bees avoid nectar colonized by three bacterial species, but not by a yeast species, isolated from the bee gut. PLoS ONE 9 (1): 1-8.
- Gordon, R.E.; Haynes, W.C. y Pang, H.-N.1973. The genus *Bacillus*. ARS.USDA. Agriculture Handbook No 427.283p.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L. 2015. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347:1255957. Doi:10.1126/science.1255957.
- Harrigan, W.F.; McCance, M. 1968. Métodos de laboratorio de Microbiología. Editorial Academia. León, España.
- Higes M, Nozal MJ, Alvaro A, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, Bernal JL, Bernal J. 2011. The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. Apidologie 42: 364 - 377.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J Invertebr Pathol 94: 211–217.
- Hornitzky, M.A.Z., Karlovskis, S., 1989, A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. Journal of Apicultural Research 28: 118-120.
- Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Dosekocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Mrazek, J., Bunesova, V., Rada, V. 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PLoS ONE 10 (3):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0118707.
- Jacobsen, C., Rosenfeldt, N., Hayford, A., Moller, P., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M. 1999, Screening of probiotics activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Applied and Environmental Microbiology 65: 4949-4957.

- Koch, H., Schmid-Hempel, P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. PNAS 108 (48): 19288–19292.
- Kwong, W.K., Engela, P., Koch, H., Moran, N.A. 2014. Genomics and host specialization of honeybee and bumblebee gut symbionts. PNAS 111(31):| 11509–11514.
- Kwong, W.K., Moran, N.A. 2015. Evolution of host specialization in gut microbes: the bee gut as a model. Gut Microbes 6:3: 214—220.
- Lee F.J., Rusch, D.B., Stewart, F.J., Mattila H.R., Newton, I.L. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. Environmental Microbiology 17(3):796–815 DOI 10.1111/1462-2920.12526.
- Li, W, Chen, Y., Cook, S.C. 2018. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. Int J Parasitol. 48:433–44.
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G., Rudi, K. 2015. Shifts in the Midgut/Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. Microbes Environ 30 (3): 235-244.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. 1999. Brock, biología de los microorganismos. 8a ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 1064 p.
- Manzano, J. 2018. El declive de las abejas. Ecocolmena. Disponible en: <https://ecocolmena.com/la-apicultura/el-declive-de-las-abejas/>. Fecha de consulta: 23 de abril de 2019.
- Martel., A.; Zeggane. S.; Drajnudel. P.; Faucon, J. Auber, TM. 2006 Tetracycline residues in honey after hive treatment. Food Additives and Contaminants 23: 265–273.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., *et al.* 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. Environ Microbiol 20:1302–29. 10.1111/1462-2920.14103.
- Mattila, H.R., Rios, D., Walker-Sperling, V.E., Roeselers, G., Newton, I.L.G. 2012. Characterization of the active microbiotas associated with honeybees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. PLoS ONE 7(3): 1-11.
- Mendoza, Y., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., Ojeda, M.P., Carrasco-Letelier, L. 2008. Factores predisponentes, pautas sanitarias y medidas de control que se deben integrar para manejar el control de la varroasis. Serie de Actividades de Difusión (INIA la Estanzuela), p 4.

- Morán, N. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Curr Opin Insect Sci.* 1(10): 22–28. doi:10.1016/j.cois.2015.04.003.
- Muñoz, I., Cepero, A., Pinto, M.A., Martín-Hernández, R., Higes, M., De la Rúa, P., 2014. Presence of *Nosema ceranae* associated with honeybee queen introductions. *Infect Genet Evol* 23:161–8.
- OIE. 2004. Varroasis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponible en: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00124.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00124.htm). Fecha de consulta: 26 de mayo de 2019.
- OIE. 2013. World Organization for Animal Health. Capítulo 2.2.4 Nosemosis de las abejas melíferas [Internet]. Terrestrial Manual; [citado 9 Oct 2015]. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.02.04\\_NOSEMOIS\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOIS_FINAL.pdf). Fecha de consulta: 29 de mayo de 2019.
- Olmos, A., Henríquez-Piskulich, P., Sanchez, C., Rojas-Herrera, M., Moreno-Pino, M., Gómez, M., Rodríguez Da Silva, R., Maracaja-Coutinho, V., Aldea, P., Trombert, A.N. 2014. Draft Genome of Chilean Honeybee (*Apis mellifera*) Gut Strain *Lactobacillus kunkeei* MP2. *Genome Announcements* 2: e01013-14-e01013-14. DOI 10.1128/genomeA.01013-14.
- Olofsson, T., Alsterfjord, M., Nilson, B., Butler, E., Vásquez, A. 2014. *Lactobacillus apinorum* sp. nov., *Lactobacillus mellifer* sp. nov., *Lactobacillus mellis* sp. nov., *Lactobacillus melliventris* sp. nov., *Lactobacillus kimbladii* sp. nov., *Lactobacillus helsingborgensis* sp. nov. and *Lactobacillus kullabergensis* sp. nov., isolated from the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 3109–3119.
- Opciones. 2018. Miel de abejas: potencial económico. Seminario Financiero y Económico de Cuba. Disponible en: <http://www.opciones.cu/cuba/2018-07-31/miel-de-abejas-potencial-economico/>. Fecha de consulta: abril 2019.
- Orłowski, A., Bielecka, M. 2006. Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 3: 269–275.
- Parrott, T.D., Rehberger, T.G., Owens, F.N., 1997. Selection of *Propionibacterium* strains capable of utilizing lactic acid from in vitro models. Oklahoma State University
- Paseyro, J. 2017. Abejas, insectos imprescindibles. *Revista Forestal* 23: 39-46.
- Pérez-Piñeiro, A. 2017. La apicultura en Cuba y su situación actual. *Agroecología* 12 (1): 67-73.

- Ptaszyńska, A.A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., Malek, W. 2016. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis. *Parasitol Res* 115:397–406.
- Ptaszyńska, A.A., Paleolog, J., Borsuk, G. 2014. *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee Intestines. *PLoS ONE* 11(10): 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0164477.
- Red por una América Libre de Transgénicos. 2016. Transgénicos, plaguicidas y el declive de la polinización y la producción melífera. Quito. p 9.
- Rokop, Z.P., Horton, M.A., Newton, I.L.G. 2015. Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. *Appl Environ Microbiol* 81:7261–7270. doi:10.1128/AEM.01259-15.
- Rosa, C. A., Lachance, M.A., Silva, J., Teixeira, A.K., Marini M.M., Antonini, Y., Martins, R. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, Volume 4 (3): 271–275. Doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010, Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1, S96-119.
- Sadoval, P. 2010. Tesis de Maestría. Aislamiento e identificación de especies del género *Bacillus* desde miel para su empleo como antagonistas a *Paenibacillus larvae*
- Salomón, R. 2018. Cuba, el potencial económico de las abejas. Fuente: Presensa Latina. Portal CUBA.CU.
- Sanabria, J.L., Rodríguez, T., Veliz, M.A., Llanes, J.R., Demedio, J., Lóriga, W., Álvarez, D. 2016. Parasitological diagnosis in honey bee in the territorial lab of imv of San José de las Lajas, Mayabeque. *Apiciencia* .XVIII (3): 35-46.
- Santiago, C. 2013. Características de la abeja melífera. Disponible en: <http://www.abejapedia.com/abeja-melífera/>. Consultado: 10 de enero 2019.
- Santos, C.M.A., Pires, M.C.V., Sánchez, L., Martins, F., Nicoli, J. 2016. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology*. 162:1195–1207
- Schillinger, U., Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environm. Microbiol.* 55(8):1901-1906
- Science, D. 2018. Probióticos que aumentan la producción de miel y la resistencia de enfermedades. Disponible en <http://api-cultura.com/los-probioticos->

aumentan-la-produccion-de-miel-y-la-resistencia-a-enfermedades. Consultado: marzo 28: 2019

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. 2018. Características generales de la abeja *Mellipona Becheei*. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/agris/article/viewFile/2650/1697>. Consultado: 10 de enero 2019.

SEFC (Seminario Económico y Financiero de Cuba). 2019. Miles de abejas con potencial económico. Publicado 31 de enero del 2019.

Suárez, D., Fajardo, M., García, R., Naranjo, Y., García, C. 2017b. Cosmetic creams elaborated from bee products. *Apiciencia XIX (1)*: 40-48.

Suárez, D., Vargas, D., Estévez, Y. 2017a. Sensorial description of PANMIEI as a nutritional complement. *Apiciencia XIX (1)*:14-26.

Tamarit, D., Ellegaard, K.M., Wikander, J., Olofsson, T., Vásquez, A., Andersson, S.G.E. 2015. Functionally structured genomes in *Lactobacillus kunkeei* colonizing the honey crop and food products of honeybees and stingless bees. *Genome Biol. Evol.* 7(6):1455–1473. doi:10.1093/gbe/evv079

Tarpy, D.R., Mattila, H.R., Newton, I.L.G. 2015. Development of the honey bee gut microbiome throughout the queen-rearing process. *Appl Environ Microbiol* 81:3182–3191. doi:10.1128/AEM.00307-15.

Taylor, K. 1995. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochem. Biotech.* 56:49-58

Vannette, R., Mohamed, A., Johnson, B.R. 2015. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports* 5:16224. DOI: 10.1038/srep16224.

Vargas, D., Estévez, Y., Suárez, D. 2017. Sensorial description of PROPOMIEL as a nutritional complement. *Apiciencia .XIX (1)*: 27-39.

Vasquez A, *et al.* 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One* 7:e33188.

Vásquez, M. 2014. Abejas meliponas en Cuba. *Vida Apícola*. Publicación de Apicultura de Montagud Editores. p 2.

Vázquez, M., del Risco, C.A., García, R., Frías, A. 2015. Evaluación de polen apícola fresco. *Apiciencia XVII (2)*: 30-41.

- Verde-Jiménez, M. 2013. Principales enfermedades de la abeja mellífera. Medidas de lucha y control. Disponible en: [http://www.204principalesenfermedades\\_abejas\\_cuba.htm](http://www.204principalesenfermedades_abejas_cuba.htm). Consultado: 1 de mayo de 2019
- Verde-Jiménez, M. Bande M.J. 2017. Principales Enfermedades de la abeja melífera. Medidas de Lucha y Control.
- Vojvodic, S., Rehan, S.M., Anderson, K.E. 2013. Microbial gut diversity of africanized and european honey bee larval instars. PLoS One 8:e72106.
- Williams GR, Sampson MA, Shutler D, Rogers REL. 2008. Does fumagillin control the recently-detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? Journal of Invertebrate Pathology, 99: 342-44.
- Williams GR, Shutler D, Little CM, Burger-Maclellan KL, Rogers RLE. 2011. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*, 42: 15-22.
- Wu, M., Sugimura, Y., Iwata, K., Takaya, N., Takamatsu, D., Kobayashi, M. Taylor, D., Kimura, K., Yoshiyama, M. 2014. Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. Journal of Insect Science 14 (129): 1-13.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., Genersch, E. 2008, Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology 10, 1612-1620.