

## Use of microbial additives in apiculture

### Utilización de aditivos microbianos en la apicultura

Grethel Milián, Marlene M. Martínez, Ana J. Rondón and Marlen Rodríguez

*Universidad de Matanzas, Autopista Varadero km 3½, Matanzas, Cuba*

*Email: grethel.milian@umcc.cu*

Grethel Milián Florido: <https://orcid.org/0000-0002-4035-8643>

Marlene María Martínez Mora: <https://orcid.org/0000-0001-7585-3725>

Ana Julia Rondón Castillo: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Marlen Rodríguez Oliva. <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

A compilation of the apiculture history, main diseases of bees, ways for their control and the use of probiotics in the care of these insects is shown. Probiotics are live microorganisms that when they are intake in adequate amounts they confer benefits to the host health. Among the most bacteria used with this purpose, are those from *Bacillus* genus and their species *subtilis*, which are highlighted due to their capacity of founded the microbial balance in the gastrointestinal tract and modulate the immune system. This performance is favorable for the processes of digestion and nutrients absorption, in addition decrease the incidence of infectious diseases. If there is evidence of the probiotic effect, *In vitro* and in vivo, of this species in a group of animals of zootecnical interest, few of their use in apiculture is known.

Key words: *bees, Bacillus subtilis, probiotics*

#### INTRODUCTION

According to Guarner and Álvarez (2020) reports, the microorganism which colonized plants and animals are a constituent, functional and non dispensable part of the host organism. An unbalanced microbiota can cause a disease, affect the body development, alter the regulation of the immune system and the metabolism, and even, negatively influenced on behavior.

The microbiota of the digestive tract of bees is very varied and it is associated to the type of feeding applied in the beehive, to the production system, the seasonal nature and the state of health (Marche *et al.* 2019). Other authors refers that melliferous bees has a high specificity of the intestinal microbial community. They are constituted, approximately, by eight phylotypes (Moran *et al.* 2012 and Khan *et al.* 2020) and there are three groups in the intestinal community: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* and *Lactobacillus spp.* (Cariveau *et al.* 2014 and Rodríguez *et al.* 2021). Other studies show the presence of 174 species (Hernández *et al.* 2020).

At the international level, is working on the incorporation into animal production of zootecnical additives that have probiotic activity, since these constitute an alternative, due to their ability to modulate the immune system and the intestinal microbiota; in addition to having an antagonistic function against

Se presenta una recopilación de la historia de la apicultura, las principales enfermedades de las abejas, las vías para su control y el uso de los probióticos en el cuidado de estos insectos. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas le confieren beneficios a la salud del huésped. Entre las bacterias más utilizadas con este fin, se encuentran las del género *Bacillus* y sus especies *subtilis*, que se destacan por su capacidad de fomentar el balance microbiano en el tracto gastrointestinal y modular el sistema inmune. Este desempeño resulta favorable para los procesos de digestión y absorción de nutrientes, además de que disminuye la incidencia de enfermedades infecciosas. Si bien existen evidencias del efecto probiótico, *In vitro* e in vivo, de esta especie en un grupo de animales de interés zootécnico, poco se conoce de su utilización en la apicultura.

Palabras claves: *abejas, Bacillus subtilis, probióticos*

#### INTRODUCCIÓN

Según los informes de Guarner y Álvarez (2020), los microorganismos que colonizan plantas y animales son parte constitutiva, funcional y no prescindible del organismo anfitrión. Una microbiota desequilibrada puede ser causa de enfermedad, afectar el desarrollo corporal, alterar la regulación del sistema inmunitario y del metabolismo, e incluso, influir negativamente en la conducta.

La microbiota del tracto digestivo de las abejas es muy variada y está asociada al tipo de alimentación que se aplica en las colmenas, al sistema de explotación, la estacionalidad y el estado de salud (Marche *et al.* 2019). Otros autores refieren que las abejas melíferas poseen alta especificidad de la comunidad microbiana intestinal. Se componen, aproximadamente, por ocho filotipos (Moran *et al.* 2012 y Khan *et al.* 2020) y predominan tres grupos en la comunidad intestinal: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* y *Lactobacillus spp.* (Cariveau *et al.* 2014 y Rodríguez *et al.* 2021). Otros estudios demuestran la presencia de 174 especies (Hernández *et al.* 2020).

En el ámbito internacional se trabaja en la incorporación a la producción animal de aditivos zootécnicos que posean actividad probiótica, pues estos constituyen una alternativa, debido a su capacidad de modular el sistema inmunológico y la microbiota intestinal; además de que tienen una función antagonista

pathogens. In the last decades is stated that the probiotics and plant extracts are the most used to improve the productive and health indicators in bees, so in Cuba is working to get their standardization (Hernández *et al.* 2020). The objective of this study was to show a compilation about the history of apiculture, the main diseases of bees and the ways for their control and the use of microbial additives in apiculture.

### APICULTURE HISTORY

The first records of melliferous bees' domestication are date back to the Egyptian tows, where hieroglyphics from the year 2400 before Christ (BC) were founded with the bee image and where the use of horizontal beehive of sun backed clay (figure 1) is observed. In the qualification of the Egypt king in the year 3100 (BC) the bee figure appears, so they had been important even before their domestication. The Persians, Syrians, Greeks and Romans towns has evidence of the apiculture practice. The honey, beeswax and propoli were used in food production, as in medicines, cosmetics and even, in the religious field. The honey was used as natural sweetener or for adding to alcoholic drinks. It was also used in holy rituals, in gods offering and in the embalming process of Egyptians nobles. In this first stage, the men begin to take out the beehives from its natural habitat and were transported. The beehives were made of different materials: clay, hollow trunk of trees, straw or wicker, and every time the honey were extracted, the bees were killing and the beehives were loss (Añón 2018).

contra patógenos. En las últimas décadas se constata que los probióticos y los extractos de plantas son los más utilizados para mejorar los indicadores productivos y de salud en las abejas, por lo que en Cuba se trabaja para lograr su estandarización (Hernández *et al.* 2020). El objetivo de este trabajo es exponer una recopilación acerca de la historia de la apicultura, de las principales enfermedades de las abejas y las vías para su control y el uso de los aditivos microbianos en la apicultura.

### HISTORIA DE LA APICULTURA

Los primeros registros de la domesticación de las abejas melíferas se remontan a los pueblos egipcios, donde se encontraron jeroglíficos del año 2400 antes de cristo (AC) con la imagen de la abeja y donde se observa el uso de colmenas horizontales de barro cocido al sol (figura 1). En la titulación del rey de Egipto en el año 3100 (AC) aparece la figura de la abeja, por lo que estas deben haber sido importantes incluso antes de su domesticación. Los pueblos persas, sirios, griegos y romanos cuentan con pruebas de la práctica de la apicultura. La miel, cera y propóleos eran muy usados en la elaboración de alimentos, como en medicinas, cosméticos, e incluso, en el ámbito religioso. La miel se utilizaba como endulzante natural o para agregar a las bebidas alcohólicas. También se empleaba en los rituales sagrados, en las ofrendas a los dioses y en el proceso de embalsamiento de los nobles egipcios. En esta primera etapa, el hombre comenzó a sacar las colmenas de su hábitat natural y las transportaba. Las colmenas se construían con diferentes materiales: barro, troncos de árboles ahuecados, paja o mimbre, y



Figure 1. Horizontal beehives of clay. Hieroglyphics that show the use of horizontal beehives close to bees (Añón 2018)

Nowadays, the apiculture or bee culture is a livestock activity directed to bee breeding (*Apis mellifera* L.). Among the positive impacts that this activity generates the important function the melliferous bees plays in the maintenance in almost all life in the earth is highlighted, because they are the main pollinates agents

cada vez que se extraía la miel, por lo general se mataban las abejas y se perdían las colmenas (Añón 2018).

En la actualidad, la apicultura o el cultivo de abejas es una actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas (*Apis mellifera* L.). Entre los impactos positivos que genera esta actividad se destaca la importante función

of commercial crops and wild flora (Arredondo 2015 and Wu *et al.* 2021). In addition, bees take part in the production of a great amount of industrial products: honey, beeswax, royal jelly, propolis, among others (Jacovi 2019 and SEFC 2019). However, despite their importance, currently in the world there is a decrease in the number of beehive.

The decrease of the number of beehives and the increase of bee mortality is due to many stress factors, which varied according to the geographic area, local characteristics or climatic conditions. Among the factors is the dangerous impact of the invader exotic species as the mite *Varroa* (*Varroa destructor*), the little beehive beetle (*Aethina tumida*), the Asiatic wasp (*Vespa velutina*), *PaeniBacillus larvae* (causal agent of American foulbrood), among others (Burnham 2019). There also considered the effect of certain active substances presents in the phytosanitary products and other biocides, the climatic change, the environmental degradation, the habitats degeneration and the progressive disappearance of angiosperms (Manzano 2018).

### MAIN BEE DISEASES AND THE CONTROL WAYS

Due to the colonial way of life of bees, they can be infected with a great variety of pathogens, among them are the mites, bacteria, fungus and virus (DeGrandi and Chen 2015). Among the most significant diseases that these microorganisms cause are the varroosis, American Foulbrood and nose-mosis, caused by the microsporidian *Nosema ceranae* and *Nosema apis* (Pérez-Piñero 2018 and Burnham 2019).

The varroosis is a parasitic disease of great significance for the apicole sector. It is considered a world disease (Sanabria *et al.* 2015). Its importance lies in the many losses of colonies that annually caused and in the affectations on honey production. That is why it should regularly controlled (Pérez-Piñero 2018).

In Spain and the rest of the European Union have an endemic character, being the only bee disease that required a systematic treatment of the colonies to keep the parasitism rate under harmful values (Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación 2023). It is similar the performance in the Americas region, where it represents the main bees enemy, and constitutes the main risk for apiculture (Masaquiza *et al.* 2019).

Cuba is not immune to these circumstances. The current practice of Cuban apiculture was transformed after the presence of *Varroa destructor* mite on the island was diagnosed in 1996. This parasite induced significant changes in the beehives management, which jointly to the economic problems that Cuba has to face, affect negatively the apiculture. Specifically, in the beehives park, of a total of 60, 000 families, approximately 40, 000 were recovered (Pérez-Piñero 2018).

*V. destructor* is a parasite mite that cause damages

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 y Wu *et al.* 2021). Además, las abejas intervienen en la producción de gran cantidad de productos de interés industrial: miel, cera, jalea real, propóleos, veneno de abejas, entre otros (Jacovi 2019 y SEFC 2019). Sin embargo, a pesar de su importancia, en el mundo se aprecia actualmente disminución en el número de colmenas.

El decrecimiento del número de colmenas y el aumento de la mortalidad de las abejas se atribuye a múltiples factores de estrés, que varían en función de la zona geográfica, las características locales o las condiciones climáticas. Entre estos factores figuran el peligroso impacto de las especies exóticas invasoras, como el ácaro *Varroa* (*Varroa destructor*), el pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*), la avispa asiática (*Vespa velutina*), *PaeniBacillus larvae* (agente causal de la Loque americana), entre otros (Burnham 2019). También se consideran los efectos de ciertas sustancias activas presentes en los productos fitosanitarios y otros biocidas, el cambio climático, la degradación ambiental, la degeneración de los hábitats y la desaparición progresiva de las angiospermas (Manzano 2018).

### PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS Y LAS VÍAS DE CONTROL

Debido al estilo de vida colonial de las abejas, se pueden infectar con una gran variedad de patógenos, entre los cuales se encuentran los ácaros, bacterias, hongos y virus (DeGrandi y Chen 2015). Entre las enfermedades más significativas que producen estos microorganismos se encuentran la varroosis, la Loque americana y la nose-mosis, provocada por los microsporidios *Nosema ceranae* y *Nosema apis* (Pérez-Piñero 2018 y Burnham 2019).

La varroosis es una enfermedad parasitaria de gran significación para el sector apícola. Se considera una enfermedad mundial (Sanabria *et al.* 2015). Su gran importancia estriba en las numerosas pérdidas de colonias que provoca anualmente y en las afectaciones que causa en la producción de miel. Es por ello que se debe controlar regularmente (Pérez-Piñero 2018).

En España y el resto de la Unión Europea tiene un carácter endémico, siendo la única enfermedad apícola que obliga a un tratamiento sistemático de las colonias para mantener la tasa de parasitación por debajo de umbrales dañinos (Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación, 2023). Es similar el comportamiento en la región de las Américas, donde representa el principal enemigo de las abejas, y constituye la principal amenaza para la apicultura (Masaquiza *et al.* 2019).

Cuba no está ajena a estas circunstancias. La práctica actual de la apicultura cubana se transformó a partir de que se diagnosticara en 1996 la presencia del ácaro *Varroa destructor* en la isla. Este parásito indujo cambios

in the bee, weakened, when depressed their immune system and favors the infection by other pathogens, is deadly if it is not adequately treated (Rosenkranz *et al.* 2010). It is all over the country, so it is needed to apply mite killer products systematically to avoid the beehives loss.

The presence of *V. destructor* in the beehives it is not only a problem itself, so it increase their virulence due to their association with different ARN virus. The virus of severe paralysis, chronic paralysis, black queen cell, sacbrood and the deformed wing are transmitted by these contaminant agents (Antúnez *et al.* 2013).

This mite feeds exclusively on the hemolymph (blood) of bees. It reproduces in the brood of worker bee and the drones, with a preference for the latter. *V. destructor* enters a cell shortly before percolation and lays eggs (first male egg, followed by a female egg) that develop inside the capped cell. The male can fertilize females that reach maturity, normally one or two within a worker bee cell, and three or four within a drone cell (Mendoza *et al.* 2008).

American Foulbrood (AFB) is produced by the pathogen *PaeniBacillus larvae*, and is the most destructive disease affecting bee brood. *P. larvae* is a *Bacillus* Gram-positive, catalase-negative, and facultative anaerobic, with low percentage of GC (Guanine and Cytosine) and endospore-forming (Genersch *et al.* 2006).

The larvae of worker bee, queen bee and drone become infected by ingesting food contaminated with *P. larvae* spores, when fed by nurse bees (Hornitzky *et al.* 1989). Once ingested, the spores reach the lumen of the larval intestine, where they germinate, and giving rise to vegetative cells. They proliferate and move towards the epithelium and destroy cell-cell interactions and invade the intercellular space, reaching the host's hemolymph very quickly. Subsequently, the larva dies, which is accompanied by sporulation of vegetative cells. The spores are spread within the beehive when cleaning bees contaminate their mouthparts by removing dead larvae and subsequently transmit them to the larvae when feeding (Yue *et al.* 2008).

*N. ceranae* is a fungus formed by microsporidia, which are obligate intracellular parasites of insects such as bees. Its infection takes place after ingesting mature spores that germinate in the intestine and form a tube that extrudes and injects the sporoplasm into the cytoplasm of epithelial cells (Hernández *et al.* 2018).

The symptoms that are noticed in the beehive affected by *N. ceranae* are dissimilar: restlessness in the bees, malnutrition, short abdomen, decreased activity and weakness. Many bees are also seen crawling in the background and on the frames. When the roof is removed, outside the beehive, it is observed that the infected bees hardly manage to fly a few

significativos en el manejo de las colmenas, lo que conjuntamente con los problemas económicos que Cuba tuvo que enfrentar, y que repercutieron en la apicultura de forma negativa. Específicamente, en el parque de colmenas, de unas 60 000 familias se recuperaron aproximadamente 40 000 (Pérez-Piñeiro 2018).

*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 (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.

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 mediante estos agentes contaminantes (Antúnez *et al.* 2013). Este ácaro se alimenta exclusivamente de la hemolinfa (sangre) de las abejas. Se reproduce en la cría de las obreras y los zánganos, con preferencia por estos últimos. *V. destructor* penetra en 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).

La Loque americana (L.A) la produce el agente patógeno *PaeniBacillus larvae*, y es la enfermedad más destructiva que afecta la cría de las abejas. *P. larvae* es un bacilo Gram positivo, catalasa negativa, anaerobio facultativo, con bajo porcentaje de GC (Guanina y Citosina) y formador de endosporas (Genersch *et al.* 2006).

Las larvas de las abejas obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas de *P. larvae*, cuando se alimentan por las abejas nodrizas (Hornitzky *et al.* 1989). 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. Posteriormente, la larva muere, lo que se acompaña de 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 (Yue *et al.* 2008).

*N. ceranae* es un hongo formado por microsporidios, los cuales son parásitos intracelulares obligados de 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 (Hernández *et al.* 2018).

meters without landing. Other times they crawl on the ground or on the leaves. The abdomen is often stretched by fecal matter and will appear shiny and greasy (Li *et al.* 2018).

In Cuba, when large infestations by *V. destructor*, *N. ceranae* and *PaeniBacillus larvae* occur, no drugs, antibiotics or chemical substances are applied to treat beehive pathologies, only integrated management is practiced, which consists of cleaning the beehives, harvesting in the apiary to avoid transporting honey or infected combs, changing queen bees and, if necessary, the beehives are sacrificed if there are outbreaks of serious infectious diseases, which leads to a decrease in the populations of these insects (Pérez-Piñero 2018).

In livestock production, the use of probiotics is known, but very little is its use in apiculture. Probiotics are live microorganisms that, when intake in adequate amounts, confer benefits to the host health (Milián *et al.* 2021). Obtaining probiotic biopreparations from the isolation and selection of beneficial microorganisms from the digestive tract of animals is the starting point for their application in animal production. These zootechnical additives are supplied with the purpose of being used as animal growth promoter, since they improve the composition of the gastrointestinal microbiota and the efficiency in the use of food, stimulate the immune system and inhibit pathogenic microorganisms without the use of antibiotics (Rondón *et al.* 2020 and Cabaña *et al.* 2021).

Recent studies by Khoury (2018) show that strains of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bourlardii* CNCM I-1079 and *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M are effective in protecting bees against fungal infections known as nosemosis (table 1). This author hypothesizes that the mechanism of action might involve an enhanced immune system and tissue repair processes to protect the host from the damage caused by the parasite. However, it could be inferred that this result can be associated with the action of probiotics, since it is one of its main mechanisms. Specifically, the biopreparations obtained from *Bacillus* strains activate the immune system, since they are considered immunomodulators par excellence (Milián *et al.* 2022).

Los síntomas que se notan en la colmena afectada por *N. ceranae* son disimiles: inquietud en las abejas, desnutrición, abdomen corto, 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).

En Cuba, cuando se producen grandes infestaciones por *V. destructor*, *N. ceranae* y *PaeniBacillus larvae*, no se aplican medicamentos, antibióticos ni sustancias químicas para el tratamiento de las patologías de las colmenas, solo se practica el manejo integrado, que consiste en el saneamiento de las colmenas, la castra en el apiario para evitar el transporte de miel o panales infectados, el cambio de abejas reinas y, de ser necesario, se realiza el sacrificio de las colmenas si se encuentran brotes de enfermedades infecciosas graves, lo que trae consigo la disminución de las poblaciones de estos insectos (Pérez –Piñero 2018).

En la producción pecuaria se conoce el uso de probióticos, pero muy poco su empleo en la apicultura. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas le confieren beneficios a la salud del huésped (Milián *et al.* 2021). La obtención de biopreparados probióticos a partir del aislamiento y selección de microorganismos benéficos procedentes del tracto digestivo de los animales, es el punto de partida para su aplicación en la producción animal. Estos aditivos zootécnicos se suministran con el propósito de ser utilizados como promotores del crecimiento animal, pues mejoran la composición de la microbiota gastrointestinal y la eficiencia en el uso de los alimentos, estimulan el sistema inmune e inhiben a microorganismos patógenos sin la utilización de antibióticos (Rondón *et al.* 2020 y Cabaña *et al.* 2021).

Estudios recientes de Khoury (2018) muestran que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *bourlardii* CNCM I-1079 y *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M son efectivas para proteger las abejas frente a infecciones fúngicas conocidas como nosemosis (tabla 1). Este autor plantea la hipótesis de que el mecanismo de acción podría involucrar un sistema inmunitario mejorado y procesos de reparación de tejidos para proteger al huésped del daño causado por el parásito. Sin embargo, se pudiera inferir

Table 1. Survival of bees treated with probiotic microorganisms

Strains	Survival of bees treated with probiotic microorganisms	
	Treatments	
	Sugar syrup (%)	Curatives followed by a nosemosis challenge (%)
<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM MA 18/5M	28.8	23
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Bourlardii</i> CNCM I-1079	29.9	41

Source: Khoury (2018)

Antunez *et al.* (2019) managed to reduce the infestation by *V. destructor*, by enhancing the effect of the synthetic acaricide and, at the same time, reducing the infection by *N. ceranae*. Probiotics can decrease the mortality rate of this infection in bees by up to 40 %.

According to Derome (2018), when bees are subjected to stress, the microorganism can evade their immune system, causing an infection that can affect feeding ability, stops larval care, alter bee orientation, and increase mortality. Hence, the researcher decided to evaluate the effectiveness of two probiotics (Bactocell® and Levucell®), these products are marketed in pig, chicken, shrimp and salmon farms. In addition, he evaluated two cultures of strains isolated from the intestinal microbiota of healthy bees, obtained under laboratory conditions, all were administered to the bees by mixing them with sugar syrups. After two weeks of testing, the mortality rate of infected bees was from 20 to 40 % lower in those receiving the probiotics and cultures than in the control group.

In recent years, the *Bacillus spp.* genus is recognized as one of the species most used as probiotics (Flores *et al.* 2018). The *Bacillus* is Gram-positive bacteria with rod-shaped, spore-forming, aerobic or facultative anaerobic (Alou *et al.* 2015).

Due to their potential, *Bacillus* can synthesize metabolites with antifungal and antibacterial activity. These antimicrobial substances are biopeptides with different chemical structures, which are used as therapeutic agents against pathogenic bacteria and fungi, able of acting on microorganisms of diverse etiology. The biocontrol effect exerted by *Bacillus spp.* is the result of various mechanisms, including antibiosis, which occurs due to the production of peptides, lipopeptides and phospholipids (Kadaikunnan *et al.* 2015, Pedraza *et al.* 2018 and Milián *et al.* 2021).

### PROBIOTICS IN APICULTURE

Researches on the use of probiotic biopreparations from *Bacillus* genus to be used in apiculture are few. Researchers carried out by Flores *et al.* (2018), showed the probiotic potential of *Bacillus* 4A, 230P and 86B strains isolated from honey and pollen from native stingless bees. They showed a marked probiotic effect on the control of pathogens such as: *Listeria innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aureuginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Audisio (2017) found beneficial results when evaluating the strain *B. subtilis* subsp. The spore counts of *Nosema spp.* and *Varroa spp.* in the treated hivebees were lower than those of the control group. These results in the experimental apiaries show that *B.*

que este resultado se puede asociar a la acción de los probióticos, pues es uno de sus mecanismos principales. Específicamente, los biopreparados obtenidos de cepas de *Bacillus* activan el sistema inmune, pues se consideran inmunomoduladores por excelencia (Milián *et al.* 2022).

Antunez *et al.* (2019) lograron disminuir la infestación por *V. destructor*, al potenciar el efecto del acaricida sintético y, a la vez, disminuir la infección por *N. ceranae*. Los probióticos pueden disminuir la tasa de mortalidad de esta infección en las abejas hasta 40 %.

Según Derome (2018), cuando las abejas están sometidas al estrés, el microorganismo puede evadir su sistema inmunológico, causando una infección que puede afectar la capacidad de alimentarse, obstaculizar el cuidado de las larvas, alterar la orientación de las abejas y aumentar la mortalidad. De ahí, que dicho investigador decidió evaluar la efectividad de dos probióticos (Bactocell® y Levucell®), dichos productos se comercializan en granjas de porcino, pollo, camarón y salmónidos. Además, evaluó dos cultivos de cepas aisladas de la microbiota intestinal de abejas sanas, obtenidos en condiciones de laboratorio, todos se administraron a las abejas mezclándolas con jarabes de azúcar. Después de dos semanas de pruebas, la tasa de mortalidad de las abejas infectadas era de un 20 a un 40 % menor en los que recibían probióticos y los cultivos que en el grupo de control.

En los últimos años se reconoce el género *Bacillus spp.* como una de las especies más utilizadas como probióticos (Flores *et al.* 2018). Los *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, con forma de barra, formadoras de esporas, aeróbica o anaeróbica facultativa (Alou *et al.* 2015).

Los *Bacillus* por su potencial pueden sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana. Estas sustancias antimicrobianas son biopéptidos con diferente estructura química, que se utilizan como agentes terapéuticos contra bacterias y hongos patógenos, capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología. El efecto bio-controlador que ejerce *Bacillus spp.*, es el resultado de diversos mecanismos, entre los que se encuentra la antibiosis, que se produce debido a la producción de péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos (Kadaikunnan *et al.* 2015, Pedraza *et al.* 2018 y Milián *et al.* 2021).

### LOS PROBIÓTICOS EN LA APICULTURA

Son escasas las investigaciones del uso de biopreparados probióticos del género *Bacillus* para ser usados en la apicultura. Investigaciones llevadas a cabo por Flores *et al.* (2018), demostraron el potencial probiótico que tienen las cepas de *Bacillus* 4A, 230P y 86B aislados de mieles y polen proveniente de abejas nativas sin aguijón. Las mismas mostraron un efecto probiótico marcado en el control de patógenos como: *Listeria innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aureuginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Audisio (2017) encontró resultados benéficos cuando

*subtilis* subsp. Mori2 favored the bees' performance. In the first place, because the microorganism stimulated the laying of the queen's eggs, which resulted in a greater number of bees and, consequently, more honey. Second, because it reduced the prevalence of two important bee diseases worldwide: noseemiasis and varroosis.

Another study was reported by Hernández *et al.* (2021). In a laboratory test, species from *Bacillus* spp. and *Brevibacillus* spp. were used, associated with melliferous bees, as natural alternative for the AFB control of and plaster brood. In this experiment favorable results are reported, when observing inhibition faced pathogens. This constitutes the first study of associations between the presence of genes related with the synthesis of antimicrobial peptides and their antagonism faced *P. larvae* and *A. apis*.

One of the affectations that currently are in the beehives is the incidence by ants, considered common visitors in the beehives. Studies performed by Ruiz *et al.* (2021), showed the antifungal effect of the *Bacillus subtilis* strain against the fungus *Aspergillus niger* and *Penicillium serie* chrysogenum isolated from the ants cuticle established in *Apis mellifera* L. beehives. activity that makes it possible to control the populations of ants that affect the beehives and an increase in the production of bees.

The studies carried out by Yépez (2019) showed the effect of *Bacillus cereus* sensu lato, when been related with the microbiota of bee honey. This author performed a microbiological analysis to 38 samples of honey coming from Mejía canton, Ecuador, and determined factors associated to the presence of the group *Bacillus cereus* sensu lato. This group was in 53 % (20/38) of the collected samples. A total of three species were identified: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* and *Bacillus thuringiensis*. Its distribution in the 20 positive samples was: 1 (5 %) *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus spp*; 2 (10 %) *Bacillus cereus* and *Bacillus mycooides*; 3 (10 %) *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*; 4 (20 %) *Bacillus mycooides* and *Bacillus thuringiensis*; 5 (25 %) *Bacillus cereus* and 6 (30 %) *Bacillus cereus* and *Bacillus spp*. This confirms the ability of sporulated Gram-positive bacilli to survive in honey.

At present, the study of the bee microbiota function continue, due to their contribution to health and to the productivity of this specie and by the influence the probiotics can have on their stabilization and on the stimulation of the immune system of bees (Al-Ghamdi *et al.* 2020).

In the Centro de Estudios Biotecnológicos, belongs to Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas, Cuba, is working on the isolation, selection and identification of the strains of acid lactic bacteria *Bacillus spp.* and yeasts with probiotic potential, from the digestive tract and the honey of *Melipona*

evaluó la cepa *B. subtilis* subsp. Los recuentos de esporas de *Nosema spp.* y *Varroa spp.* en las colmenas tratadas fueron más bajos que en las del grupo control. Estos resultados en los apiarios experimentales indican que *B. subtilis* subsp. Mori2 favoreció el desempeño de las abejas. En primer lugar, porque el microorganismo estimuló la puesta de huevos de la reina, lo que se tradujo en un mayor número de abejas y, en consecuencia, más miel. En segundo lugar, porque redujo la prevalencia de dos enfermedades importantes de las abejas en todo el mundo: la noseemiasis y la varroosis.

Otro estudio fue reportado por Hernández *et al.* (2021). En un ensayo a nivel de laboratorio se utilizaron especies de *Bacillus* spp. y *Brevibacillus* spp., asociadas con abejas melíferas, como alternativa natural para el control de LA y cría yesificada. En dicho experimento se reportan resultados favorables, al observarse inhibición ante los patógenos. Este constituye el primer estudio de asociaciones entre la presencia de genes relacionados con la síntesis de péptidos antimicrobianos y su antagonismo ante *P. larvae* y *A. apis*.

Una de las afectaciones que se presenta en la actualidad en las colmenas es la incidencia por las hormigas, consideradas visitantes comunes en las colmenas. Estudios realizados por Ruiz *et al.* (2021), demuestran el efecto antifúngico de la bacteria *Bacillus subtilis* frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium serie* chrysogenum aislados de las cutículas de hormigas establecidas en colmenas de *Apis mellifera* L. actividad que posibilita el control de las poblaciones de hormigas que afectan a las colmenas y un incremento de la producción de las abejas.

Los estudios realizados por Yépez (2019) muestran el efecto de *Bacillus cereus* sensu lato, al estar relacionado con la microbiota de la miel de abejas. Este autor realizó un análisis microbiológico a 38 muestras de miel provenientes del cantón Mejía, Ecuador, y determinó factores asociados a la presencia del grupo *Bacillus cereus* sensu lato. Este grupo estuvo presente en 53 % (20/38) de las muestras recolectadas. Se identificaron tres especies: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides* y *Bacillus thuringiensis*. Su distribución en las 20 muestras positivas fue: 1 (5 %) *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus spp*; 2 (10 %) *Bacillus cereus* y *Bacillus mycooides*; 3 (10 %) *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*; 4 (20 %) *Bacillus mycooides* y *Bacillus thuringiensis*; 5 (25 %) *Bacillus cereus* y 6 (30 %) *Bacillus cereus* y *Bacillus spp*. Esto confirma la capacidad de bacilos Gram positivos esporulados a sobrevivir en la miel.

En la actualidad, se continúa el estudio de la función de la microbiota de las abejas, por su contribución a la salud y a la productividad de esta especie y por la influencia que pueden tener los probióticos en su estabilización y en la estimulación del sistema inmune de las abejas (Al-Ghamdi *et al.* 2020).

En el Centro de Estudios Biotecnológicos, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas, Cuba, se trabaja en el aislamiento, selección e identificación de cepas de

*beecheii* B. The antimicrobial activity of *Apis mellifera* and *Melipona beecheii* honeys against pathogenic microorganisms is also evaluated.

Álvarez (2020) studied a total of eight pathogenic strains, four reference strains from Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli*. ATCC 25922, *Streptococcus sp.* and *E. coli*) and four belonging to isolations of cows with mastitis (C7, C8, C9 and C15), which were identified by traditional methods (two *Staphylococcus aureus* and two *Bacillus sp.*). The evaluation of the inhibitory effect was quantitatively performed, by numeric measurement of the inhibition halos, and qualitatively, taking as reference the pattern proposed by Duraffourd *et al.* (1987). The results of the inhibitory effect of *M. beecheii* and *A. mellifera* honeys against pathogenic microorganisms, are shown in table 2. It is observed that the *Apis mellifera* and *Melipona beecheii* honeys have inhibitory action in the most of the studied pathogenic microorganisms, so it constitutes an alternative for the treatment of cattle mastitis, as well as for some of the apiaries diseases.

bacterias ácido lácticas, *Bacillus spp.* y levaduras con potencial probiótico, a partir del tracto digestivo y la miel de *Melipona beecheii* B. También se evalúa la actividad antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* ante microorganismos patógenos.

Álvarez (2020) estudió un total de ocho cepas patógenas, cuatro cepas de referencia del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli*. ATCC 25922, *Streptococcus sp.* y *E. coli*) y cuatro pertenecientes a aislamientos de vacas con mastitis (C7, C8, C9 y C15), que se identificaron por métodos tradicionales (dos *Staphylococcus aureus* y dos *Bacillus sp.*). La evaluación del efecto inhibitorio se realizó cuantitativamente, por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente, al tomar como referencia el patrón propuesto por Duraffourd *et al.* (1987). Los resultados del efecto inhibitorio de las mieles de *M. beecheii* y *A. mellifera* ante microorganismos patógenos, se muestran en la tabla 2. Se observa que las mieles de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* tienen acción inhibitoria en la mayoría de los microorganismos patógenos estudiados,

Table 2. Inhibitory effect of *M. beecheii* and *A. mellifera* honeys against pathogenic microorganism.

Strains	Treatments						
	MM100%	MM50%	MM30%	AB	MA100%	MA50%	MA30%
C9 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) (+++)	22.6±2.5 <sup>a</sup> (+++)	21.3±2.0 <sup>a</sup>					
	18.0±2.0 <sup>a</sup> (+++)	17.6±0.5 <sup>a</sup>	16.6±0.5 <sup>a</sup> (++)	9.6±1.2 <sup>b</sup>	4.0±1.7 <sup>c</sup>		
C7 ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	20.3±1.5 <sup>a</sup> (+++)	19.0±2.0 <sup>a</sup> (++)	12.3±3.2 <sup>b</sup> (+)	23.6±0.5 <sup>a</sup>	11.0±0.3 <sup>b</sup> (+)	8.6±2.5 <sup>b</sup> (+)	1.2±0.2 <sup>c</sup> (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16.4±0.5 <sup>a</sup> (++)	15.2±0.7 <sup>ab</sup> (++)	13.5±0.7 <sup>b</sup> (+)	22.1±0.2 <sup>c</sup>	8.0±1.0 <sup>d</sup> (+)	6.0±1.0 <sup>de</sup> (-)	4.5±0.5 <sup>e</sup> (-)
<i>Streptococcus sp.</i>	19.6±0.6 <sup>a</sup> (++)	18.0±1.0 <sup>a</sup> (++)	15.3±0.6 <sup>b</sup> (++)	27.3±0.6 <sup>c</sup>	11.3±0.6 <sup>d</sup> (+)	1.2±0.2 <sup>e</sup> (-)	0.8±0.01 <sup>e</sup> (-)
C8 ( <i>Bacillus sp.</i> )	6.6±0.6 <sup>a</sup> (-)	5.6±1.5 <sup>a</sup> (-)	0.7±0.2 <sup>b</sup> (-)	25.0±1.0 <sup>c</sup>	0.7±2.0 <sup>b</sup> (-)	0.4±0.15 <sup>b</sup> (-)	0.2±0.09 <sup>b</sup> (-)
C15 ( <i>Bacillus sp.</i> )	8.7±1.5	0.7±0.2 <sup>b</sup> (-)	0.6±0.2 <sup>b</sup> (-)	25.0±0.6 <sup>c</sup>	0.6±0.2 <sup>b</sup> (-)	0.4±0.1 <sup>b</sup> (-)	0.2±0.05 <sup>b</sup> (-)
<i>Escherichia coli</i> . ATCC 25922	5.1±2.0 <sup>a</sup> (-)	.7±1.1 <sup>a, b</sup> (-)	0.7±0.1 <sup>b</sup> (-)	31.3±1.5 <sup>c</sup>	4.0±1.0 <sup>ab</sup> (-)	1.0±0.1 <sup>b</sup> (-)	0.9±0.2 <sup>b</sup> (-)
<i>E. coli</i>	5.0±1.0 <sup>a</sup> (-)	0.8±0.05 <sup>b</sup> (-)	0.6±0.05 <sup>b</sup> (-)	31.0±1.0 <sup>c</sup>	0.7±0.05 <sup>b</sup> (-)	0.6±0.05 <sup>b</sup> (-)	0.2±0.05 <sup>b</sup> (-)

Different letters in the same row show significant differences between means with P<0.05.

Duraffourd scale: (-) Null, (+) sensitive, (++) very sensitive, (+++) extremely sensitive.

*M. beecheii* (MM) and it is assigned the corresponding percentage (MM100 %, MM50 %, MM30 %) and for *A. mellifera* honey (MA100 %, MA50 %, MA30 %).

## CONCLUSIONS

The use of probiotic biopreparations from *Bacillus sp.* strains and other microbial genera reaffirm the real possibility of their use, since they represent economic advantages for any farmer, not only due to loss reduction, so because these products show for bees an impact on physiological and productive responses in the apiaries,

por lo que constituye una alternativa para el tratamiento de la mastitis bovina, así como para algunas de las enfermedades que se presentan en los apiarios.

## CONCLUSIONES

El empleo de biopreparados probióticos a partir de cepas de *Bacillus sp.* y otros géneros microbianos



which are superior to what its cost of production might be.

#### Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest between them.

#### Author's contribution

Grethel Milián Florido: Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Supervision and Writing – review.

Marlene María Martínez Mora: Funding acquisition

Ana Julia Rondón Castillo: Funding acquisition and Supervision.

Marlen Rodríguez Oliva: Funding acquisition.

reafirman la posibilidad real de su uso, pues representan ventajas económicas para cualquier productor, no solo por reducción de pérdidas, sino porque estos productos para las abejas muestran un impacto en las respuestas fisiológicas y productivas en los apiarios, que resultan superiores a lo que pudiera ser su costo de producción.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflictos de intereses entre ellos.

#### Contribución de los autores

Grethel Milián Florido: Conceptualización, Adquisición de fondos, Investigación, Supervisión y Redacción – revisión.

Marlene María Martínez Mora: Adquisición de fondos.

Ana Julia Rondón Castillo: Adquisición de fondos y Supervisión.

Marlen Rodríguez Oliva: Adquisición de fondos.

## REFERENCES

- Al-Ghamdi, A., Al-Abbadi, A.A., Khan, K.A., Ghramh, H.A., Ahmed, A.M. & Ansari, M. J. 2020. "In vitro antagonistic potential of gut bacteria isolated from indigenous honey bee race of Saudi Arabia against *PaeniBacillus larvae*". Journal Apicultural Research. 59 (5): 825- 833, ISSN: 0864-0394. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1706912>.
- Alou, M. T., Rathored, J., Khelaifia, S., Michelle, C., Brah, S., Diallo, B. A. & Lagier, J.C. 2015. "Bacillus rubiinfantis sp. nov. strain mt2(T), a new bacterial species isolated from human gut". New Microbes and New Infections, 8: 51–60. ISSN: 2052-2975. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.09.008>.
- Álvarez, A.B.S. 2020. Evaluación de la actividad antimicrobiana de mieles de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* frente a microorganismos. patógenos. Tesis presentada al título de Ingeniera agrónoma. Universidad de Matanzas, Cuba. p.53.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C., Martin-Hernández, R., Higes, M. & Zunino, P. 2013. Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. INIA Serie de difusión N°41. ISSN: 1688-924X.
- Antúnez, K., Arredondo, D., Castell, L., Silva, F., Añón, G., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C. & Zunino, C. P. 2019. Desarrollo de una estrategia natural para el control de integrando el uso de probióticos y productos orgánicos. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay. ISSN: 1688-924X. Serie: FPTA N° 75. ISBN: 978-9974-38-415-6. Available: <http://www.inia.uy>.
- Añón, B. B. 2018. Efecto de la administración de un probiótico sobre distintos patógenos que afectan la salud de las abejas melíferas. Tesis para optar por el título de Licenciado en Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable", Montevideo Uruguay. p 43.
- Arredondo, D. 2015. Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay. p 80.
- Audisio, M. C. 2017. "Gram-positive bacteria with probiotic potential for the *Apis mellifera* L. honey bee: the experience in the Northwest of Argentina. Probiotics and Antimicrobial". Proteins Journal, 9 (1): 22-31, ISSN: 1867-1314. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9231-0>.
- Burnham, A. J. 2019. "Scientific Advances in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*)". Frontiers in Veterinary Science, 6: 79, ISSN: 2297-1769, <http://doi.org/10.3389/fvets.2019.00079>.
- Cabaña, J. M., Tejerina, M. R., Castro, M. R. & Benítez, M. R. A. 2021. "Probiotic potential of bacteria isolated from pollen bread to improve the production and health of *Apis mellifera*". IDESIA (Chile), 39(1): 45-51, ISSN: 0718-3429.
- Cariveau, D. P., Powell, J. E., Koch, H., Winfree, R. & Moran, N. A. 2014. "Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*)". Multidisciplinary Journal Microbial Ecology (ISME), 8(12): 2369- 2379, ISSN: 1751-7370. <http://doi.org/10.1038/ismej.2014.68>.
- DeGrandi, G. & Chen, Y. 2015. "Nutrition, immunity and viral infections in honey bees". Current Opinion in Insect Science, 10: 170–176, ISSN: 2214-5745. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>.
- Derome, N. 2018. Probióticos para proteger a las abejas de una infección asociada con el trastorno del colpso de colonias. Observatorio para la Innovación Silvoagropecuaria y la Cadena Agroalimentaria, Chile. Available: <https://opia.fia.w3-article-91670>.
- Duraffour, C.; Hervicourt, L. & Lapraz, J. 1987. Cuadernos de fitoterapia clínica. 4ta ed. Barcelona: Masson. ISSN: 1695-4238.
- Florencia, A. A., Gómez, J. S. & Salomón, V. 2018. Potencial probiótico de cepas de *Bacillus* aisladas de miel y polen de Tucuman. XXVI Jornada de Jóvenes Investigadores. Universidad Nacional del Guyo, Argentina.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J. & Fries, I. 2006. "Reclassification of *PaeniBacillus larvae* subsp *pulvifaciens* and *PaeniBacillus larvae* subs *P. larvae* as *PaeniBacillus larvae* without subspecies differentiation". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 501-511, ISSN: 1466-5026. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0>.

- Guarner, F. A. & Álvarez, G. C. 2020. Anales de Microbiota, Probióticos y Prebióticos: año cero. 2020. Editorial XI Workshop Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, 1 (1): 1, ISSN: 2695-6837. Available: [www.ergon.es](http://www.ergon.es).
- Hernández, J.E.G., Rodríguez, J.A.D., Estrada, O.C., Solenzal, Y. V., Fernández, K. L. & Rondón, A.J.C. 2021. "Potencialidades del empleo de aditivos zootécnicos en la apicultura cubana". Pastos y Forrajes. 44: eE14, ISSN: 0864-0394.
- Hernández, J. E. G., Rodríguez, J. A. D., Sebastián, L. F., Fernández, K. J. L., Solenzal, Y. V., Paola, L. S. & Vicedo, D. G. 2020. "Isolation and identification of lactic acid bacteria from the digestive tract of adult bees *Apis mellifera*". Revista de Salud Animal, 42 (2), ISSN: 0253-570X.
- Hernández, R. M., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García, P. P., Meana, A., Pinto, A. M., Soroker, V. & Higes, M. 2018. "*Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective". Environmental Microbiology, 20(4): 1302–1329, ISSN: 1462-2920. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103>.
- 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, ISSN: 0864-0394. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100831>.
- Jacovi, G. 2019. Apicultores nicaragüenses necesitan préstamos tras un "dulce" APEN. Available: <http://apen.org.ni/apicultores-nicaraguenses-necesitan-prestamos-tras-dulce-2018/>.
- Kadaikunnan, S.; Rejiniemon, T. S.; Khaled, J. M.; Alharbi, N. S. & Mothana, R. 2015. "*In vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*". Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 14: 9. ISSN: 1476-0711, <http://doi.org/10.1186/s12941-015-0069-1>.
- Khan, K. A., Al-Ghamdi, A. A., Ghramh, H. A., Ansari, M. J., Ali, H., Alamri, S.A., Al-Kahtani, S.N., Adgaba, N., Qasim, M. & Hafeez, M. 2020. "Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees". Microbial Pathogenesis, 138:103793, ISSN: 1096-1208. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103793>.
- Khoury, S. 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. Frontiers Ecology Evolution, ISSN: 2045-7758. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00058>.
- 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". International Journal Parasitology, 48:433–44, ISSN: 1383-5769.
- Manzano, J. 2018. El declive de las abejas. Ecocolmena. Available: <https://ecocolmena.com/la-apicultura/el-declive-de-las-abejas/>.
- Marche, M. G., Satta, A., Floris, I., Puseddu, M., Buffa, F. & Ruiu L. 2019. "Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies". Journal of Apicultural Research, 58(3): 444-454, ISSN: 0864-0394. <http://doi.org/10.1080/00218839.2019.1589669>.
- Masaquiza, D. A. M., Curbelo, L.M., Díaz, D. L. B. & Arenal, C. A. 2019. "Varroasis and Defense (*Apis mellifera*) Mechanisms of honey bees". Revista de Producción Animal, 31(3), ISSN: 2224-7920.
- Mendoza, Y., Ramallo, G., Díaz, C. S., Ojeda, M.P. & Carrasco, L. L. 2008. Factores predisponentes, pautas sanitarias y medidas de control que se deben integrar para manejar el control de la varroasis. Serie de Actividades de Difusión (INIA la Estanzuela), p 4.
- Milián, G., Beruvides, A., Pérez, Y., Rodríguez, M., Rondón, A.J. C., Pérez, M. Q. & Placeres, I. 2022. "Effect of the inclusion of SUBTILPROBIO® zootechnical additive in the production of different livestock categories in Matanzas. Technical note22". Cuban Journal of Agricultural Science, 56 (3): 183-190, ISSN: 2079-3480.
- Milián, G., Rodríguez, M. O., González, O., Rondón, A.J.C., Pérez, M.L.Q., Beruvides, A.R. & Placeres, I. 2021. "Evaluation of the zootechnical additive SUBTILPROBIO® E-44 in productive and health indicators in heavy pure breeds birds under production conditions". Cuban Journal of Agricultural Science, 55(1): 67-75, ISSN: 2079-3480.
- Ministerio Agricultura, Pesca y Alimentación 2023. Varroosis. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es>.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E. & Sabree, Z.L. 2012. "Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees". Journal Information PLOS ONE, 7(4): e36393, ISSN: 1932-6203. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.003639>.
- Pedraza, L.A., López, C.E. & Vélez, D.U. 2018. "Mechanisms of action of *Bacillus spp.* (*Bacillaceae*) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants". Acta Biológica Colombiana, 25(1): 112-125. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>.
- Pérez-Piñeiro A. 2018. "La apicultura en Cuba y su situación actual". Agroecología, 12(1): 67–73. Available: <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/330361>
- Rodríguez, D. J. A., Hernández, G. J. E., Sebastián, F. L., Fernández, L. K. L., Sánchez, L. & Valdivia, S. 2021. "Caracterización *In vitro* de propiedades probióticas de *Lactobacillus spp.* aislados del tracto digestivo de las abejas". Revista de Salud Animal, 43 (2), ISSN: 2224-4700. Available: <http://revista.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1162>.
- Rondón, A. J., Rodríguez, M., Milián, G. & Beruvides, A. 2020. "Probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* in animals of zootechnical interest". Cuban Journal of Agricultural Science, 54 (2): 1-11, ISSN: 2079-3480.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. & Ziegelmann, B. 2010. "Biology and control of *Varroa destructor*". Journal of Invertebrate Pathology, 103 Suppl 1, S96-119, ISSN: 0022-2011. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>.
- Ruíz, G. B., Retamoso, R. M. & Benítez, A. M. 2021. "*Bacillus subtilis* inhibition tests on fungus transported by invasive ants from honeybee hives". AGRARIA. 37(3):87-92, ISSN: 0719-3882. <http://dx.doi.org/10.29393/chjaas37-28bsgm30028>.
- Sanabria, J. L., Demedio, J., Pérez, T., Peñate, I., Rodríguez, D. & Loriga, W. 2015. "Índices de infestación por *Varroa destructor* en colmenas sin medidas de control". Rev. Salud Animal, 37(2): 118-124, ISSN: 2224-4700.
- SEFC (Seminario Económico y Financiero de Cuba). 2019. Miles de abejas con potencial económico. Publicado 31 de enero del 2019.

- Wu, Y., Zheng, Y., Wang, S., Chen, Y., Tao, J., Chen, Y., Chen, G., Zhao, H., Wang, K., Dong, K., Hu, F., Feng, Y. & Zheng, H. J. 2021. "Genetic divergence and functional convergence of gut bacteria between the Eastern honey bee *Apis cerana* and the Western honey bee *Apis mellifera*". Journal of Advance in Research, 10(37): 19-31. ISSN: 2090-1232. <http://doi.org/10.1016/j.jare.2021.08.002>.
- Yépez, A. B. R. 2019. Determinación de la presencia o no de *Bacillus cereus* sensu lato en miel de abejas de apiarios del cantón Mejía de la provincia de Pichincha, Ecuador. Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista. p77.
- 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, ISSN: 1462-2920. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x>.

**Received: November 25, 2022**

**Accepted: January 31, 2023**