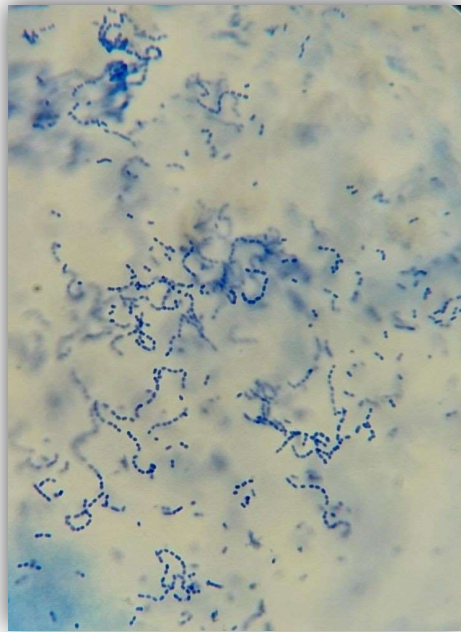




UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
TRABAJO DE DIPLOMA



**Título:** Selección de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii*.

**Autor(a):** Elizabeth Cepero Pereira.

**Tutor(a):**

- Lic. Marlene María Martínez Mora, M. Sc.
- Lic. Ana Julia Rondón Castillo, Dr. C.

Matanzas, 2023

*“Si la abeja desapareciera de la faz de la Tierra, al hombre solo le quedarían cuatro años de vida. Ninguna abeja, ninguna polinización, ninguna planta, ninguna animidad, sin animales, sin hombre.”*

*Maurice Maeterlinck.*

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD**

Declaro que yo, Elizabeth Cepero Pereira soy el único autor de este Trabajo de Diploma o Ejercicio Profesional por lo que autorizo a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo, con la finalidad que estime conveniente.

Firma: \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA:**

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a **mis tutoras** por ser excepcionales en todos los sentidos, por su orientación, dedicación y mentoría en el desarrollo de mi tesis. Han sido faros de sabiduría en este viaje académico, y no podría haber llegado hasta aquí sin su apoyo incondicional. Siempre llevaré sus consejos conmigo y recordare este capítulo de mi vida con gratitud y aprecio hacia ustedes.

A **mis padres** gracias por ser el pilar de mi vida. Su apoyo incondicional desde el primer día alentándome a perseguir mis sueños y han estado presentes en cada paso de mi camino. Su confianza y palabras de alientos han sido un motor constante de motivación.

Gracias **mi querida hermana** por no soltar nunca mi mano, por ser mi compañera de vida y mi apoyo emocional en cada altibajo de este viaje. Aprecio profundamente tu apoyo incondicional y el vínculo maravilloso que compartimos.

## **OPINIÓN DEL TUTOR**

## RESUMEN:

La investigación tuvo como objetivo seleccionar cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* que mejoren la salud y la productividad de *Apis mellifera*. Se aislaron un total de 13 cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y se caracterizaron sus propiedades probióticas *in vitro* teniendo en cuenta diferentes criterios de selección. En el estudio de capacidad de crecimiento, las mejores cepas con concentración celular  $\geq 9$  Log UFC mL<sup>-1</sup> fueron: L6, L34. En cuanto a la obtención de ácidos orgánicos en el medio, sobresalió la cepa L13 como mayor productora. Todas las cepas tuvieron actividad antimicrobiana frente al patógeno *P. larvae* donde L31 fue superior con halos de 43,33 mm. La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas frente a 18 antibióticos mostró un patrón de resistencia a Aztreonam, Fosfomicina, Kanamicina y Neomicina con sensibilidad a los restantes antibióticos. La prueba hidrofobicidad con xileno y tolueno como solventes orgánicos arrojó que todas las cepas a excepción de la L34 presentaron clasificación alta. Se evaluó la resistencia osmótica al jarabe en concentraciones de azúcar 1000g/L y 2000 g/L. Sólo se observó crecimiento en la concentración 1000g/L, donde L31 fue superior en cuanto a viabilidad. Las cepas seleccionadas con mejor potencial probiótico fueron L31, L13, L34 y L6.

## ABSTRACT

The objective of the research was to select strains of *Lactobacillus spp.* with probiotic potential from the digestive tract of *Melipona beecheii* that improve the health and productivity of *Apis mellifera*. A total of 13 strains belonging to the *Lactobacillus* genus were isolated and their probiotic properties were characterized in vitro taking into account different selection criteria. In the growth capacity study, the best strains with cell concentration  $\geq 9$  Log CFU mL<sup>-1</sup> were: L6, L34. Regarding the obtaining of organic acids in the medium, the L13 strain stood out as the highest producer. All strains had antimicrobial activity against the pathogen *P. larvae* where L31 was higher with halos of 43.33 mm. The antimicrobial susceptibility of the strains against 18 antibiotics showed a pattern of resistance to Aztreonam, Fosfomicin, Kanamycin and Neomycin with sensitivity to the remaining antibiotics. The hydrophobicity test with xylene and toluene as organic solvents showed that all strains except for L34 presented a high classification. Osmotic resistance to syrup was evaluated at sugar concentrations of 1000g/L and 2000g/L. Growth was only observed at the 1000g/L concentration, where L31 was superior in terms of viability. The strains selected with the best probiotic potential were L31, L13, L34 and L6.

## Glosario de Términos

<b>μL</b>	microlitro
<b>BAL</b>	Bacterias Ácido Lácticas
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<b>g</b>	gramo
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocidas como seguras
<b>h</b>	hora
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	miligramo
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milímetro
<b>MRS</b>	Agar Man-Rogosa-Sharpe
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>P</b>	Probabilidad
<b>PBS</b>	Buffer fosfatado salino
<b>TGI</b>	Tracto Gastrointestinal
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>≥</b>	Igual o mayor
<b>%</b>	Porcentaje



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
1.1- Importancia de la meliponicultura en Cuba	3
1.2- Características generales de la abeja <i>Melipona beecheii</i>	6
1.3- Anatomía digestiva de la abeja <i>Melipona beecheii</i>	8
1.4- Composición de la microbiota del tracto digestivo de la abeja <i>Melipona beecheii</i>	8
1.5- Patógenos que afectan a <i>Apis mellifera</i> .	9
1.6- Concepto de probiótico.	10
1.7- Principales microorganismos utilizados como probióticos. Criterios de selección	11
1.8- Características generales del género <i>Lactobacillus</i> .	13
1.9- Efecto de la aplicación de probióticos en la abeja <i>Apis mellifera</i> .	14
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
2.1- Aislamiento y selección de cepas de microorganismos con potencial probiótico del tracto digestivo de <i>Melipona beecheii</i> B.	16
2.2- Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.	17
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>21</b>
3.1- Selección de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. con potencial probiótico del tracto digestivo de <i>Melipona beecheii</i> B.	21
3.2- Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.	21
3.3- Valoración económica, social y ambiental de bacterias con capacidad probióticas en la apicultura.	31
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>33</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS</b>	

# Introducción

## INTRODUCCIÓN

Las abejas, en particular la especie *Apis mellifera*, desempeñan un papel esencial en los ecosistemas naturales y en la producción agrícola, pues son las responsables de la polinización de una amplia variedad de cultivos a nivel mundial. De ellas podemos obtener la miel y otros productos apícolas que son empleados en la industria alimentaria, cosmética y en la medicina tradicional (Alqarni *et al.*, 2018)

A pesar de su importancia, las abejas se enfrentan a numerosos desafíos como la destrucción de sus hábitats, la exposición a pesticidas, presencia de especies invasoras además de la afectación por numerosos agentes patógenos que pueden deteriorar su salud y supervivencia. Entre los patógenos que afectan a las abejas se encuentran las bacterias, hongos, virus y ácaros que provocan un impacto negativo en la despoblación de las colmenas (Pasupuleti *et al.*, 2017).

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).

En este contexto, el uso de microorganismos probióticos se ha convertido en un área de interés, pues existe un incremento en la búsqueda de soluciones sostenibles para fortalecer la salud de las abejas y mitigar los efectos de los patógenos.

La abeja nativa *Melipona beecheii* coexiste junto con *Apis mellifera* en Cuba y a diferencia de la melífera, es más resistente a las infecciones. 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.

Existe muy poca información sobre la microbiota presente en el tracto digestivo de estas abejas, por lo que la selección de microorganismos con capacidad probiótica a partir de este ecosistema se presenta como una estrategia prometedora para el tratamiento y la prevención de enfermedades en las abejas de la especie *Apis mellifera* (Evans *et al.*, 2007).

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.

**Problema científico:**

La incidencia de microorganismos patógenos en los apiarios provoca un impacto negativo en la salud y productividad de las abejas.

**Hipótesis:**

La selección de cepas del género *Lactobacillus* spp. a partir del tracto digestivo de *Melipona beecheii* permitirá obtener microorganismos con capacidad probiótica para mejorar la salud de *Apis mellifera*.

**Objetivo general:**

Seleccionar cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* que mejoren la salud y la productividad de *Apis mellifera*.

**Objetivos específicos:**

- Aislar bacterias del género *Lactobacillus* del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii* B.
- Caracterizar *in vitro* las propiedades probióticas de las cepas de *Lactobacillus* spp. teniendo en cuenta los criterios de selección.

# Revisión Bibliográfica

## 1- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1- Importancia de la meliponicultura en Cuba:

Las abejas sin aguijón han sido importantes para las civilizaciones mesoamericanas como fuentes de alimento, medicina y artesanía (Crane, 1992; Quezada *et al.*, 2001). La principal especie en Mesoamérica antes de la colonización europea era *Melipona beecheii* Bennett, 1831 (Quezada *et al.*, 2018; May *et al.*, 2019). A diferencia de Mesoamérica, en Cuba no existe una huella cultural de la meliponicultura y la única especie de abeja social precolombina, *M. beecheii* B., conocida como “abeja de la tierra”, sufrió una verdadera depredación a partir de la conquista española, al mismo tiempo que la pérdida progresiva de sus condiciones naturales de vida (Genaro & Lóriga, 2018).

La meliponicultura es la actividad llevada a cabo por el hombre para la cría y manejo de las “abejas sin aguijón”. A partir de la segunda mitad del siglo XIX, en Cuba se incrementa el interés por la cría de meliponas, favorecido por la publicación de Poey (1851), quien da a conocer datos de su historia natural y propiedades de la miel, aunque al final del artículo recomienda, desafortunadamente, la introducción en Cuba de otras especies suramericanas de “abejas sin aguijón”, aunque esto nunca se llevó a cabo.

Somerford (1902) comenta sobre la estructura de las colmenas de meliponas usadas en Cuba y plantea que no producen tanta miel como *Apis mellifera*, por lo que no tienen valor para industrializar su producción, aunque las propiedades de la miel y el uso de la cera son reconocidas por los campesinos.

Root (1903) también describe las colmenas pertenecientes a un campesino, posiblemente de Pinar del Río, e informa sobre la estructura del nido, así como la cantidad de miel que produce (Genaro & Lóriga, 2018). Sin embargo, la actividad ha iniciado un ascendente y prometedor camino que precisa incrementar el conocimiento de este animal, su fisiología, biología, comportamiento, manejo y salud (Machado *et al.*, 2019).

Actualmente la meliponicultura presenta un nivel de desarrollo incipiente, aunque es una actividad en incremento. A diferencia de la actividad apícola, que tuvo mayor

apoyo y divulgación por la Empresa Cubana de Apicultura (APICUBA), la meliponicultura nunca fue considerada como una actividad generadora de ingresos (Genaro, 2006; Lóriga, 2015).

La meliponicultura comienza a tener mejor organización y seguidores en la última década, creándose una Agricultura Urbana que se orienta hacia la multiplicación de la especie *M. beecheii*, con la finalidad de aprovechar sus servicios en la polinización en huertos y organopónicos, así como en obtener mayor producción de miel. Se hacen esfuerzos conjuntos entre la Universidad Agraria de La Habana, APICUBA y la Asociación Cubana de Producción Animal (ACPA) para organizarla. Aunque aún falta un vínculo más estrecho con el sistema de la Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar y todavía no existe un sistema de comercialización de esta miel. En Cuba predominan productores con números reducidos de colmenas, emplazadas fundamentalmente en las cercanías de sus viviendas. La tendencia ha sido la captura independiente por campesinos (sin entrenamiento) de colonias en estado salvaje, colocadas en el interior de troncos de árboles o cajas y llevadas cerca de la casa, para su consumo familiar (figura 1 y 2) (Genaro & Lóriga, 2018).



**Figura 1 y 2.** Troncos huecos, Catalina de Güines y Sierra La Güira, Pinar del Río, respectivamente (Genaro & Lóriga, 2018).

La actividad melipónica, con carácter empresarial, apenas se ha iniciado en Cuba, destacándose en este aspecto el Centro de Abejas Meliponas de la Empresa Agropecuaria Horquita, de la provincia Cienfuegos. En este centro existe una excelente organización y meliponarios diversificados en función de su propósito productivo (centro de trasiego y desarrollo, centro de reproducción, meliponarios base y meliponarios secundarios). Estos meliponicultores, mediante la multiplicación artificial, han incrementado el número de colonias hasta 200 colmenas y han logrado introducir la especie en la polinización de cultivos y detener la sustracción de colonias del medio (Álvarez, 2014).

El propósito fundamental de su tenencia es el uso de la miel como alimento o medicina en el ámbito familiar.

En el subprograma de Apicultura y Polinización de los lineamientos de la Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar (MINAG, 2015), se enuncian dentro de sus objetivos trabajar por una cultura en el uso de las abejas para la polinización, capacitar a los productores, potenciar la crianza de la abeja en las formas productivas (al menos dos colmenas por hectárea), y garantizar su correcto manejo.

Existe gran interés en la actividad y su posible inserción en la rama pecuaria, por lo que desde el 2015 se ha organizado progresivamente y las especies de abejas son reconocidas tanto en el Decreto-Ley No. 31 de Protección Animal (Ministerio de justicia, 2021) como en el Anteproyecto de Ley de Ganadería (MINAGRI, 2022). Si hasta hoy el interés fundamental ha sido la miel, un valor agregado subyacente como la polinización brinda nuevas oportunidades, porque estas abejas poseen un mecanismo adicional por vibración (buzz-pollination), que las hace muy efectivas en determinados cultivos de importancia económica (Garibaldi *et al.*, 2015).

El estado de la conservación de *M. beecheii* en Cuba, constituye el área con las mayores poblaciones en estado silvestre, así como un auge en la cría y manejo de la «abeja de la tierra», impulsado por un grupo de entusiastas que estimulan la cría de las abejas para obtener la miel, así como para la polinización. Pero esta motivación debe tener cuidado con la introducción en el medio natural de cientos de colmenas, como en ocasiones se propone. Estos planes de desarrollo deben ser

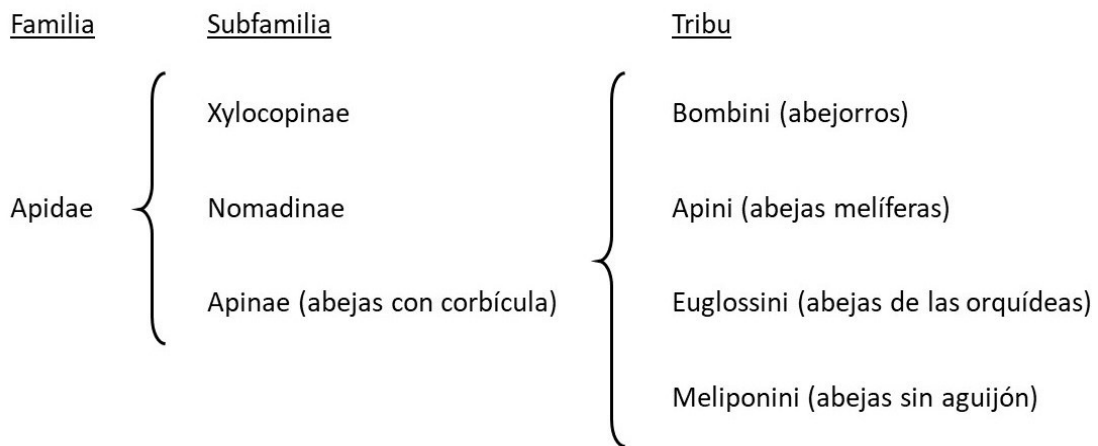


consecuentes, teniendo en cuenta la posible competencia con las abejas nativas y la presencia de otra especie social e introducida: *A. mellifera*, la cual cuenta con miles de individuos, recolectando polen y néctares en el medio natural (Díaz & Mizota, 2019).

### 1.2- Características generales de la abeja *Melipona beecheii*.

Comúnmente se considera que las abejas sin aguijón (*Meliponini*) son originarias de África. Las meliponas son un grupo grande que comprende alrededor de 500 especies (Michener, 2013); que desempeñan el papel principal en la polinización de las plantas nativas. El nombre común de estos insectos (abejas sin aguijón) proviene del hecho de que las abejas de este grupo poseen aguijones reducidos, que no se utilizan para la defensa. Las obreras de la mayoría de estos insectos se defienden de los enemigos deambulando el cuerpo del atacante, picándolo con las mandíbulas, tirando y sujetando las mandíbulas dentro de él.

Taxonómicamente pertenecen a la familia *Apidae*, que comprende tres subfamilias y cuatro tribus (figura 3).



**Figura 3.** Clasificación taxonómica simplificada de las abejas sin aguijón, tribu Meliponini. Tomado de Fonte-Carballo (2023).

Biesmeijer (1997) señala que las abejas de la tribu *Meliponini*, a diferencia de la mayoría de las especies que se conocen, viven en colonias permanentes con una reina, varias docenas o miles de obreras y son altamente sociales (eusociales). Se distinguieron 56 géneros dentro de *Meliponini*, entre los cuales, tres son los más comunes e incluyen a: melipona de las zonas tropicales de América del Sur, melipona de las zonas tropicales de África y trigona, documentada en las zonas tropicales del mencionado continente. De importancia económica son las especies de géneros *Melipona* y *Trigona* (Camargo, 1996). Sin embargo, hasta el momento *M. beecheii* B., es la única especie dentro de este grupo manejada por el hombre en Cuba y que constituye el ganado meliponícola cubano (Lóriga, 2015).

El tamaño de estos insectos varía desde los 16 mm (en un trabajador del género *Trigona*) hasta unos 2 cm en la especie de *Melipona*. Son de color negro a dorado; algunas especies tienen brillo cuerpos, mientras que otros están cubiertos de pelo. El cuerpo de las abejas de la tribu *Meliponini* se componen de tres partes: la cabeza (céfalo), el tronco (tórax) y el abdomen. La cabeza contiene un par de antenas, un par de ojos compuestos, ojos simples y aparato bucal para masticar y chupar. El tórax tiene dos pares de alas membranosas y tres pares de patas. Las abejas, como únicos himenópteros, tienen la capacidad de recolectar polen. El aparato polínico de las Meliponas es una cesta situada en las patas traseras. La cesta de polen está construida de pelos largos y gruesos, que rodean la parte externa, no peluda, superficie cóncava y lisa de las patas traseras. Los cabellos sujetan un bulto de polen, pegado a las patas traseras y forma la trampa de polen. Las abejas se alimentan de polen y néctar de plantas. Dependiendo de la especie, pueden volar hasta 2 km de sus nidos. Algunos representantes de las meliponas recogen resina de troncos y ramas de árboles.

La estrategia de alimentación ocurre en tres especies de meliponas del grupo *Trigona hypogea*. Trabajadoras de estas abejas alimentan a sus larvas con tejidos parcialmente digeridos de animales muertos vertebrados (Bağ-Badowska *et al.*, 2019)

### **1.3 -Anatomía digestiva de la abeja *Melipona beecheii*.**

La abeja *Melipona beecheii* es una especie de abeja sin aguijón nativa de México y Centroamérica. En cuanto a la anatomía del tracto digestivo, esta abeja tiene un tubo digestivo que consta de tres partes: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior. El intestino anterior es el más corto y se extiende desde la boca hasta el buche, que es una expansión del tubo digestivo que almacena y transporta el néctar recolectado. El intestino medio es más largo y se extiende desde el buche hasta el intestino grueso. En el intestino medio, las enzimas digestivas descomponen los azúcares y las proteínas. El intestino grueso es la parte más ancha del tubo digestivo y se encarga de la absorción de agua y la eliminación de los desechos sólidos (Thoman, 2023).

### **1.4- Composición de la microbiota del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii*.**

La comunidad microbiana presente en el intestino de las abejas melíferas está caracterizada por la presencia de nueve grupos bacterianos dominantes. Estos son específicos de estos insectos y pueden transmitirse por interacciones sociales entre ellas (Kwong *et al.*, 2016). Los cinco grupos principales de bacterias son: grupo de bacterias gramnegativas (*Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apicola*), miembros del filo *Proteobacteria* a bacterias grampositivas (Kwong *et al.*, 2018) *Firmicutes* (*Lactobacillus Firm-4* y grupos de *Lactobacillus Firm-5*) (Kwong *et al.*, 2016), filo *Actinobacteria* (*Bifidobacterium asteroides*) (Bottacini *et al.*, 2012) un pequeño número de especies de *Proteobacteria* (*Frischella perrara*, *Bartonella apis*, *Parasaccharibacter apiu* y un grupo de especies relacionadas con *Gluconobacter* designado Alfa). A lo largo de millones de años, estas bacterias formaron juntas una comunidad microbiana especializada que ha coevolucionado y se ha diversificado con sus abejas hospederas (Kwong *et al.*, 2016). Esta comunidad es muy dinámica y adaptativa, ya que su existencia está influenciada por varios factores como la nutrición, el entorno de la colmena, la interacción social y la edad de las abejas melíferas mientras que su composición sigue patrones estacionales (Lamei, 2018).

La microbiota intestinal de las abejas sin aguijón (Meliponini), se encuentra poco estudiada y parece variar más con respecto a la microbiota de otras abejas sociales (Koch, 2013; Kwong, 2017; Díaz, 2017)

Según Cerqueira *et al.* (2021) existe una ausencia de determinados simbioses en la abeja *Melipona* correspondiente a los géneros *Snodgrassella* y *Gilliamella*, los cuales pueden contribuir a la salud de las abejas melíferas y los abejorros (Mockler, 2018; Rothman, 2019). Esto puede ser debido a que la abeja sin aguijón haya sufrido cambios ecológicos que los liberen de la dependencia de la nutrición o defensa basada en simbioses. Alternativamente, los miembros persistentes de la microbiota ancestral o los simbioses recién adquiridos, pueden compensar la ausencia de estos géneros. *Melipona* conserva microorganismos pertenecientes a las familias características de las abejas como son: *Lactobacillaceae*, *Acetobacteraceae* y *Bifidobacteriaceae*, que en teoría podrían haber adquirido nuevas funciones como: capacidades metabólicas y protectoras. También ha adquirido nuevas asociaciones microbianas, como las cepas ambientales de *Lactobacillus*, *Floriccoccus* y miembros de la familia *Acetobacteraceae*. Aunque la evidencia filogenética sugiere que se adquieren del entorno, la prevalencia de estos taxones apunta hacia una asociación estable y posiblemente funcional. Además de estos grupos bacterianos ciertos hongos también están asociados con este tipo de abeja.

### **1.5- Patógenos que afectan a las abejas melíferas.**

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. 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 & Bande, 2017). En la tabla 1, se presentan algunas de las enfermedades más recurrentes en la abeja melífera, provocadas por bacterias, ácaros y hongos.

**Tabla 1.** Principales enfermedades de las abejas producidas por bacterias y hongos.

Nombres de la enfermedad	Agentes etiológicos	Estadios susceptibles	Síntomas
Loque americana. (Enfermedad bacteriana)	<i>Paenibacillus larvae</i>	Larvas	Afecta a las colmenas a escala global. Las larvas afectadas se vuelven marrones y pegajosas, y pueden emitir un olor a podrido. Las larvas muertas se secan (Stephan <i>et al.</i> , 2020).
Nosemosis	Causado por tres especies distintas de microsporidios (antiguamente clasificados dentro del género <i>Nosema</i> , y actualmente incluidas dentro del género <i>Vairimorpha</i> (Yuri <i>et al.</i> , 2020; Imani <i>et al.</i> , 2022). <i>Vairimorpha apis</i> , <i>V. ceranae</i> y <i>V. neumannii</i> (Martín <i>et al.</i> , 2018).	Todas las castas y edades de abejas melíferas.	Provoca inquietud en las abejas, disminución de la actividad y debilitamiento. Incapacidad para volar, temblores de alas, movimientos espasmódicos causados por inanición. El abdomen a menudo está extendido por las materias fecales, y se verá brillante y grasiento. Muerte de abejas adultas. (Li <i>et al.</i> , 2018).
Varroasis	<i>Varroa destructor</i> (un ectoparásito, forético obligado de las especies de abeja <i>Apis cerana</i> y <i>Apis mellifera</i> ).	Afecta tanto a zánganos (adultos y en estadio larval) como a obreras adultas (Wang <i>et al.</i> , 2020).	Colmenas débiles, deformación de las alas, abejas mal formadas, desorganización social, consumo anormal de las reservas de miel, pequeño grupo de abejas débiles y crías salteadas. Alteraciones en las colmenas y aumento de la mortalidad (Noël <i>et al.</i> , 2020).

**Fuente:** Solmaz *et al.* (2021)

### 1.6-Concepto de probiótico.

El concepto de probiótico fue acuñado inicialmente por Lilly & Stillwell (1965), quienes lo definieron como un factor microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. Luego de este hecho su uso dentro de la alimentación animal se

impulsó en los años setenta del siglo pasado, donde Parker (1974) utilizó por primera vez el término “probiótico” en el contexto de producción animal. Desde entonces, las definiciones propuestas para este han sido innumerables, siendo la dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la más usada en la actualidad al definirlos como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero (Molina, 2019). En otras palabras, para que un microorganismo sea considerado probiótico, debe demostrar de manera concluyente su impacto positivo en la salud del individuo, en la cual se encuentre presente o sea administrado (Paguay & Pintado, 2023).

De acuerdo con la FAO (2020) y la OMS (2022), los probióticos tienen efectos positivos en la salud del organismo anfitrión, incluyendo la regulación de la microbiota intestinal, una mayor capacidad para resistir la colonización de bacterias dañinas y un fortalecimiento de la respuesta inmunológica en la mucosa intestinal. Estos beneficios se traducen en un estado de salud mejorado, una menor presencia de patógenos y, como consecuencia, una disminución en el riesgo de transmisión de agentes patógenos a lo largo de la cadena alimentaria (Guzmán *et al.*, 2022).

### **1.7- Principales microorganismos utilizados como probióticos. Criterios de selección.**

La mayoría de los microorganismos utilizados como probióticos, pertenecen a un grupo de bacterias denominadas bacterias del ácido láctico (BAL), representado por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común.

La atención se centra en estas bacterias debido a que han sido utilizadas en la industria alimentaria de forma segura durante siglos para elaborar productos fermentados, así como también mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos. En general, las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporuladas, usualmente no móviles, microaerófilas hacia la anaerobiosis, oxidasa y catalasa negativas. Se puede clasificar a las BAL en base a los productos generados durante la fermentación de los carbohidratos. El grupo llamado homofermentativo produce

ácido láctico como principal producto en el proceso. Se puede incluir dentro de este grupo a los géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y la mayoría de las especies de *Lactobacillus*. En cambio, el grupo llamado heterofermentativo, no solo genera ácido láctico en el proceso sino también: acetato, etanol y CO<sub>2</sub>. Dentro de este grupo están los géneros: *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus*. Las bifidobacterias no se incluyen dentro del grupo de las BAL pero también son comúnmente empleados como probióticos.

En particular, el género *Lactobacillus* es considerado un excelente candidato para ser utilizado como probiótico, producen ácido láctico y otras sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas capaz de inhibir el crecimiento y la fijación de bacterias patógenas que pueden provocar enfermedades.

Existe gran variedad de productos probióticos que son comercializados, tales como los probióticos nativos, representados por microorganismos de la flora de la porción gastrointestinal de los animales, donde destacan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Lactococcus* como los más utilizados (Alayande *et al.*, 2020).

**Tabla 2:** Bacterias ácido-lácticas empleadas como probióticos.

Géneros	Probiótico
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. cellobiosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. cremoris</i> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i> <i>S. faecium</i> <i>S. diacetylacti</i> <i>S. intermedius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. adolescentes</i> <i>B. animalis</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>

**Fuente:** Tomado de Barros (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

#### **1.8- Características generales del género *Lactobacillus*.**

El género *Lactobacillus* está integrado por bacilos Gram positivos, no formadores de esporas, fermentativos, anaerobios facultativos, con importantes requerimientos nutricionales y un alto contenido de guanina y citosina en su ADN. Teniendo como fuente de carbono a la glucosa, pueden ser homofermentativos, cuando el producto final de su metabolismo es casi exclusivamente ácido láctico, o heterofermentativos cuando producen una mezcla de ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol y/o ácido acético (Galarza, 2012). Son resistentes a la acidez gastrointestinal y las condiciones biliares, capaces de adherirse a la mucosa intestinal, mejoran el intestino microbiota, y reducir el crecimiento de bacterias indeseables (Abushelaibi *et al.*, 2017).

Actualmente, el género *Lactobacillus* cuenta con algo más de 80 especies reconocidas, caracterizadas por una alta diversidad, la disponibilidad de las secuencias completas del genoma de algunos miembros de este género ha permitido confirmar su extrema divergencia, que se refleja en la dificultad para su clasificación taxonómica (Ramírez *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Lactobacillus* son habitantes normales del tracto gastrointestinal y mucosas de los seres humanos, también se encuentran en vegetales y en alimentos fermentados de origen animal y vegetal, en la industria alimentaria y desde tiempos antiguos han sido utilizados para la elaboración y conservación de alimentos (Lozada, 2001).



En la actualidad una de las principales áreas de investigación en el género *Lactobacillus*, se basa en la comprobación de las propiedades probióticas que tienen muchos de sus miembros. El descubrimiento de nuevos candidatos o nuevas aplicaciones de los ya existentes, genera grandes expectativas para el desarrollo en campos como la nutrición, la salud y la industria alimentaria (Peng *et al.*, 2020).

### **1.9- Efectos de la aplicación de probióticos en la abeja *Apis mellifera*.**

En el campo de la nutrición animal, los probióticos se utilizan para protegerlos contra bacterias patógenas específicas; además de que tienen efectos beneficiosos en el rendimiento de la especie (Markowiak & Śliżewska, 2018). Normalmente, los mecanismos de acción de los probióticos son la modulación del equilibrio de la microbiota en el tracto gastrointestinal, el mejoramiento de la digestión, la absorción de nutrientes y la estimulación de la inmunidad para mantener la salud de los animales. Mediante la exclusión competitiva estos microorganismos secretan sustancias que inhiben el crecimiento o matan y alteran la expresión génica de los agentes patógenos. Los probióticos utilizados en la producción y salud apícola se incluyen, fundamentalmente, como suplemento en el sirope y el polen y es el género *Lactobacillus* el más empleado (Mudroňová *et al.*, 2011).

Investigaciones llevadas a cabo por Florencia *et al.* (2018), demostraron el potencial probiótico que tienen las cepas de *Bacillus* 4A, 230P y 86B aislados de mieles y polen proveniente de abejas nativas sin aguijón. Las mismas mostraron un efecto probiótico marcado en el control de patógenos como: *Listeria innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Forsgren *et al.* (2010) realizó estudios *in vitro* donde se observó que la administración de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, a larvas infectadas con *P. larvae*, redujeron de manera significativa la mortalidad de las mismas. En otro ensayo se observaron resultados similares en el caso de infección con el patógeno bacteriano *M. plutonius* (Vásquez *et al.*, 2012).

La administración de cepas de *L. kunkeei* en abejas adultas consiguió disminuir el número de esporas de *N. ceranae*, demostrándose así un posible efecto antimicrobiano (Arredondo *et al.*, 2018)

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 loque americana y la cría versificada. 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*.

# Materiales y métodos

## **2.- MATERIALES Y MÉTODOS:**

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

### **2.1- Aislamiento y selección de cepas de microorganismos con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B.**

#### **2.1.1- Obtención de cepas de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B.**

Se colectaron abejas vivas de colmenas sanas pertenecientes a diferentes apiarios de la Empresa Apícola de Matanzas. Para el aislamiento de las bacterias del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii* se siguió el protocolo descrito por Engel *et al.* (2013). Las abejas de cada uno de los lotes fueron previamente desinfectadas (Solución clorada al 1 %) y lavadas tres veces con solución salina peptonada estéril (SSPE) para eliminar contaminantes externos. Se extrajeron asépticamente los intestinos de las abejas y se homogenizaron 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 realizaron 8 diluciones seriadas y cada dilución se sembró en placas con agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Alemania) para el crecimiento de *Lactobacillus* spp.

Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias con morfología diferente. Una vez obtenidos los cultivos puros de cada aislamiento, las BAL se conservaron en agar tioglicolato suplementado con carbonato de calcio y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

En primera instancia, los aislamientos se clasificaron de acuerdo a la morfología, tinción de Gram y análisis microscópico. Fueron seleccionadas para el estudio las que cumplieran con las características presuntivas del género *Lactobacillus*: colonias elevadas, de superficie gruesa y brillante, bordes elevados, coloración blanquecina y cremosa (Mathialagan *et al.*, 2018). La Tinción de Gram y la prueba de catalasa permitieron la selección inicial de las colonias con características culturales presuntivas del género estudiado (presencia de forma bacilar, cocobacilos, Gram positivo, catalasa y oxidasa negativos) (Gerhardt *et*

*al.*, 1994). La prueba de la catalasa se determinó al colocar una gota de H<sub>2</sub>O en un portaobjetos conjuntamente con una porción de la colonia tomada de un cultivo fresco. La reacción de oxidasa se determinó a través de discos Bio- Rad® según las instrucciones del fabricante (Hernández *et al.*, 2020).

## **2.2- Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.**

### **2.2.1- Capacidad de crecimiento.**

Para determinar si existían diferencias entre las cepas en cuanto a la capacidad de crecimiento, se realizó un ensayo a partir de cultivos frescos a 37°C durante 24h en caldo MRS de los diferentes aislamientos. Se prepararon diluciones en el mismo medio con una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala McFarland (OD<sub>600</sub> = 0,132, 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/ml) y se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en frascos con 50 mL del mismo medio y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones estáticas. Se tomaron muestras de los cultivos a las 0 y 24 horas para realizar posteriormente el conteo de viables a través del método de diluciones seriadas. Las placas con MRS se incubaron a 37°C por 48 horas. El ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento (Harrigan & McCance, 1968). Se tomará como criterio de selección para cepas candidatas a probióticos aquellas que muestren un crecimiento  $\geq 9 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ .

### **2.2.2- Producción de ácidos orgánicos.**

La producción de ácidos orgánicos por BAL se determinó por una titulación ácido-base, según Santos *et al.* (2016). Los lactobacilos se cultivaron 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 (9 Log 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 homogeneizaron. Esta mezcla (10 mL) se tituló con NaOH 1M y se utilizó 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 utilizó como control la cepa C65 de *Lactobacillus salivarius* y los resultados se expresaron en g.L<sup>-1</sup>. Se tomará como criterio de selección las cepas mejores productoras de ácidos orgánicos.

### **2.2.3- Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a *Paenibacillus larvae*.**

Para la realización de la actividad antimicrobiana se utilizó un aislamiento bacteriano *P. larvae* procedente del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spiritus, Cuba y los aislamientos obtenidos a partir del intestino de abejas meliponas. Se empleó el método de difusión de sustancias en agar propuesto por Schillinger & Lucke (1989). Se tomaron 200 µL del cultivo del patógeno que se encontraba a una concentración correspondiente a la escala 0,5 de MacFarland y se inoculó en tubos de ensayos con 20 mL de agar J. Luego de su homogenización, se vertieron en placas Petri (por triplicado) para su solidificación. Con ayuda de un sacabocado metálico estéril, se abrieron pocillos de 5 mm de diámetro donde se añadieron 60 µL de los sobrenadantes de cada una de las variantes en estudio. Dichas placas se mantuvieron en refrigeración (4°C) por 4 h para mayor difusión de las sustancias en el agar. Posteriormente, las placas se incubaron entre 24 y 48 horas a 37°C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos. Por último, se midió el halo con regla milimetrada y se le restó el diámetro de los pocillos. Se tomará como criterio de selección para cepas candidatas a probióticos aquellas que muestren los mayores diámetros de inhibición.

### **2.2.4- Susceptibilidad antimicrobiana.**

Para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* a 18 antibióticos diferentes de las cepas en estudio, se utilizó el método de difusión en discos (Bauer *et al.* 1966) en agar MRS a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, debido a las exigencias nutricionales y fisiológicas de los lactobacilos. Los discos utilizados fueron: ampicillin (AMP) (10 µg), ampicillin/sulbactam (AMS) (20 µg), augmentin (AUG) (30 µg), aztreonam (ATM) (30 µg), bacitracina (Bacit) (40U), cefepine (FEP) (30 µg), ceftiofur (CFT)(30 µg), cloranfenicol (Clor) (60 µg), doxiciclina (DXT) (30µg), eritromicina (E) (15 µg), fosfomicina (FOS) (200 µg), gentamicina (10 µg), kanamicina (K) (30 µg), oxacillin (OX) (1 µg), penicilina G (P) (10 IU), piperacillin (PRL) (100µg), piperacillin/tazabactam (TZP) (110 µg), tetraciclina (TE) (30 µg). A las 24 horas de incubación, se midieron los halos de inhibición obtenidos con una regla milimetrada. Cada análisis se realizó por triplicado. Se tomará como criterio de

selección para cepas candidatas a probióticos aquellas que muestren sensibilidad a la mayoría de los antibióticos probados.

### **2.2.5- Hidrofobicidad**

Se determinó la hidrofobicidad superficial de las cepas aisladas de *Lactobacillus* spp. mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico que presentan las células cultivadas en sistema de dos fases (agua- disolvente orgánico), como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios. Para evaluar la hidrofobicidad en la superficie bacteriana se realizó un ensayo según las indicaciones reportadas por Frizzo *et al.* (2006) para determinar, a través de porcentajes de hidrofobicidad, la tendencia a la adhesión epitelial (mayor porcentaje de hidrofobicidad, mayor adherencia). Cada una de estas cepas crecidas de cultivo fresco en caldo MRS a 37°C se lavaron con solución tampón de fosfato salino (PBS) y se ajustaron a una densidad óptica de 0,6-0,7 a 560 nm ( $DO_{560nm}$ ) y se mezclaron con la misma cantidad de tolueno y xileno, a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min, se midió la  $DO_{560nm}$  de la fase acuosa. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Hidrofobicidad} = \frac{DO_{560nm} \text{ antes de mezclar} - DO_{560nm} \text{ despues de mezclar}}{DO_{560nm} \text{ antes de mezclar}} \times 100$$

La actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como alta (51-100%), media (30- 50%) y baja (0-29 %), según lo propuesto por Nader-Macías (2008).

Se tomará como criterio de selección aquellas cepas candidatas a probióticos que alcancen una clasificación alta.

### **2.2.6- Resistencia osmótica al jarabe**

Se prepararon suspensiones de los aislamientos obtenidos en PBS, a partir de cultivos en agar MRS a 37°C durante 24 h. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 4 de la escala Mc Farland ( $DO_{600} = 0,669$ ,  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Paralelamente, se preparó 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 realizaron dos suspensiones bacterianas en jarabe 1:1

y 2:1 a una concentración final de  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> y se incubaron a 37°C durante 72 h. El número de células bacterianas viables en cada tratamiento se determinó por recuento en placa en agar MRS a las 0 y 72 h. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (Antúnez *et al.*, 2015). Se tomará como criterio de selección definitivo para este estudio aquellas candidatas a probióticos que mantengan la viabilidad después de las 72 h.



# Resultados y discusión

### **3- RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

#### **3.1- Selección de cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B.**

Se aislaron un total de 13 cepas del tracto digestivo de *M. beecheii* con características distintivas del género *Lactobacillus* spp las cuales poseían los siguientes rasgos morfológicos, bioquímicos y tintoriales: colonias con bordes elevados, coloración blanquecina y cremosa de superficie gruesa y brillante. Al microscopio se observaron bacilos Gram positivos que reaccionaron negativamente a las pruebas de catalasa y oxidasa.

Morais *et al.* (2013) aislaron BAL del tracto intestinal de las abejas sin aguijón y a su vez sugieren su presencia en las mieles ya sean frescas o fermentadas. En estudios recientes se han aislado y caracterizado cepas de *Bacillus* spp. de miel de *Heterotrigona itama* (Ngalimat *et al.*, 2020) y otras bacterias ácido lácticas de miel de meliponas con potencial probiótico (Mohd *et al.*, 2015).

Tales bacterias pueden tener funcionalidad tanto tecnológica como fisiológica, pero a la fecha son escasos los estudios que reportan el potencial probiótico de BAL aisladas de abejas sin aguijón o de productos de la misma (Fernández-Robledo *et al.*, 2020).

El aislamiento de cepas de *Lactobacillus* spp. del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii* B. permite obtener microorganismos mejor adaptados a este ecosistema y podrán ser utilizadas como probióticos en *Apis mellifera*.

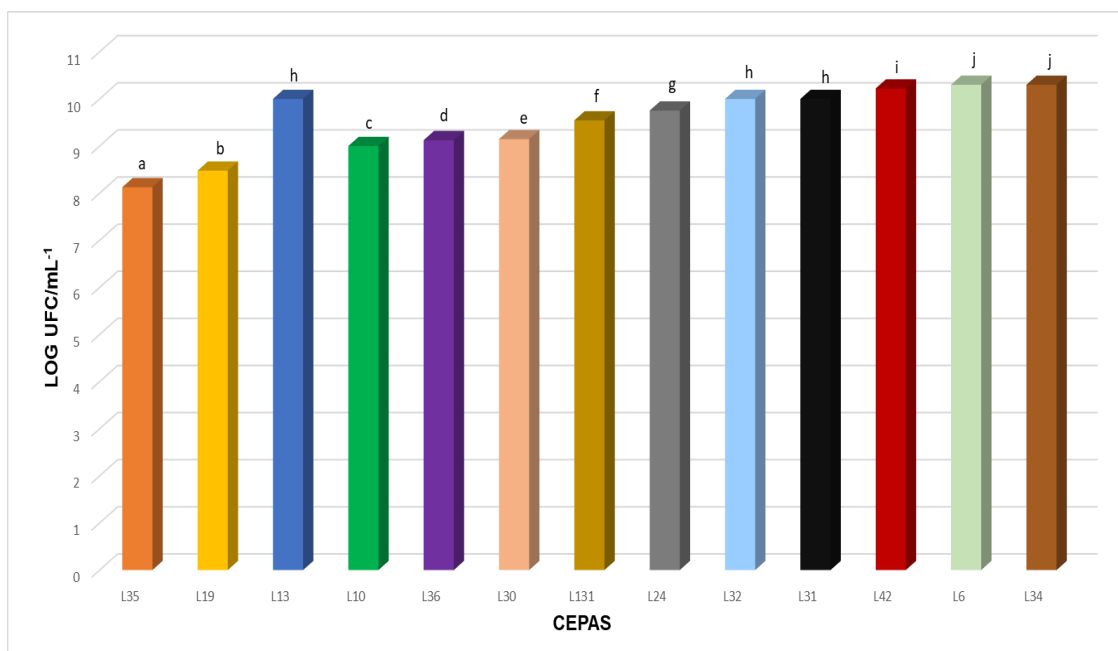
#### **3.2- Selección de las cepas probióticas a partir de diferentes criterios.**

##### **3.2.1- Capacidad de crecimiento.**

En la figura 4 se aprecian los resultados de la capacidad de crecimiento de las cepas en estudio a las 24 horas en caldo MRS. Se destacan por presentar valores de concentración celular superiores a 9 Log UFC. mL<sup>-1</sup> las cepas: L6, L34, L42, L31, L32, L24, L131 y L13. Los aislados con mejores resultados (p<0,001) fueron la L6 y L34 sin diferencias significativas entre ellos.

Una propiedad que debe caracterizar a los probióticos es la alta tasa de crecimiento, ya que los mismos deben aplicarse en cantidades suficientes para llegar al TGI, resistir los impedimentos químicos que se presentan y ser capaces

de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal (Sosa *et al.*, 2018).



**Figura 4.** Capacidad de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* spp. en MRS transcurridas 24 h de incubación a 37 °C. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas según Prueba de Turkey HSD ( $p < 0,001$ ).

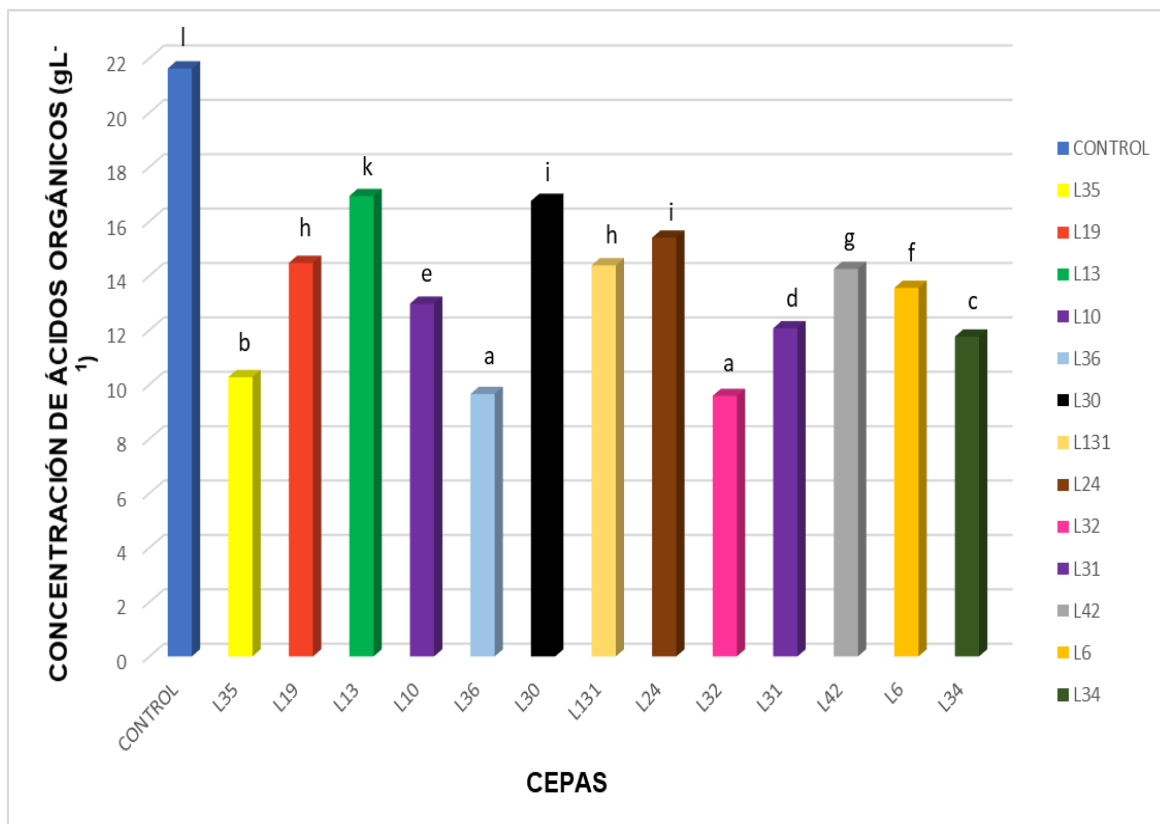
### 3.2.2- Producción de ácidos orgánicos.

En la figura 5 se muestra la producción de ácidos orgánicos por las cepas estudiadas. Se demuestra la capacidad que tienen los aislados de producir estas sustancias con efecto antimicrobiano, donde L13 es la mejor estadísticamente con 16,93 g.L<sup>-1</sup>. El menor valor observado fue para L32 y la L36 con 9,58 g.L<sup>-1</sup> y 9,65 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. Estas dos cepas no mostraron diferencias significativas entre ellas.

Los lactobacilos que se seleccionen como probióticos deben producir elevadas cantidades de ácidos orgánicos, pues esta es una condición necesaria para la eliminación de patógenos en el tracto gastrointestinal, además que esta acidificación acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Rodríguez *et al.*, 2021). Esta característica ha sido reportada por diversos autores en la literatura consultada.

Arredondo (2015) determinó la producción de ácidos grasos volátiles secretados en 8 cepas de *Lactobacillus* por HPLC. Todos los aislamientos produjeron ácido

láctico, aunque también se detectó la presencia de otros como: acético, cítrico, succínico y propiónico.



**Figura 5.** Producción de ácidos orgánicos por diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas según Prueba de Turkey HSD ( $p < 0,001$ )

Muchos factores pueden estar involucrados en la actividad antibacteriana de las BAL que incluyen metabolitos como el ácido láctico o el ácido acético además de otras sustancias antimicrobianas que ellas pueden producir como son las bacteriocinas o el peróxido de hidrógeno que actúan en la membrana plasmática de otros microorganismos. La producción de esta clase de sustancias es una característica a tener en cuenta al momento de elegir una cepa probiótica ya que pueden participar en el control de microorganismos patógenos que afecten el ecosistema gastrointestinal (Guzmán *et al.*, 2022).

### 3.2.3- Determinación de la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas frente a *Paenibacillus larvae*.

Todas las cepas tuvieron actividad antimicrobiana frente al *P. larvae*. De los 13 aislamientos estudiados, L31 y L6 alcanzaron los mejores halos de inhibición y

no mostraron diferencias significativas con L34, L42, L24, L36 y L13 (ver tabla 3) (Anexo 1).

**Tabla 3.** Resultados de los diámetros de inhibición observados frente a *Paenibacillus larvae* para las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas según Prueba de Turkey HSD ( $p < 0,001$ )

Cepas productoras	Diámetro de inhibición (mm)
L19	18,33 <sup>a</sup>
L10	24,33 <sup>ab</sup>
L131	28,33 <sup>abc</sup>
L32	30,33 <sup>bcd</sup>
L35	30,66 <sup>bcd</sup>
L30	31,67 <sup>bcd</sup>
L36	33,66 <sup>bcde</sup>
L34	35,00 <sup>bcde</sup>
L13	38,33 <sup>cde</sup>
L42	39,00 <sup>cde</sup>
L24	40,66 <sup>de</sup>
L6	42,66 <sup>e</sup>
L31	43,33 <sup>e</sup>
EE	1,76
P	0,001

Estos resultados son superiores a los observados por Rodríguez *et al.* (2021) quienes midieron halos de 14,83 mm y 12 mm para cepas de *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 respectivamente, las cuales fueron aisladas del tracto digestivo de *Apis mellifera*.

Otros autores también demuestran la capacidad que tienen las bacterias ácido lácticas de inhibir a este patógeno (Yoshiyama *et al.*, 2013; Al-Ghamdi *et al.*, 2021).

Betesho *et al.* (2019) utilizaron la cepa ATCC 23272 de *L. reuteri* la cual demostró actividad antagonista *in vitro* contra el crecimiento y la formación de biopelículas de *P. larvae* debido a naturaleza ácida del sobrenadante libre de sus células.

Killer *et al.* (2014) probaron cepas autóctonas de BAL aisladas de fuentes relacionadas con las abejas que incluían una cepa de *Lactobacillus* (*L. apis* sp. nov.) aislado del cultivo de la miel (estómago) y detectado principalmente en el tracto digestivo de abejas melíferas de 3 días de edad, obreras forrajeras y zánganos de abejas melíferas quien demostró actividad *in vitro* frente a este patógeno.

Arredondo *et al.* (2018) evaluaron en larvas y abejas adultas la acción benéfica de una mezcla de cuatro cepas de *Lactobacillus kunkeei*, aisladas de la comunidad microbiana intestinal del insecto. Su administración en modelos controlados de laboratorio disminuyó la mortalidad asociada a la infección por *P. larvae* en las larvas y los recuentos de esporas de *V. ceranae* de abejas melíferas adultas. Estos resultados sugieren que la mezcla de este microorganismo beneficioso puede ser una estrategia atractiva para mejorar la salud de las abejas

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos capacidad de crecimiento, la producción de ácidos orgánicos y la actividad antimicrobiana, se realizó una preselección de las mejores cepas candidatas a probióticas teniendo en cuenta los resultados que arrojaron los análisis estadísticos.

Fueron seleccionadas para continuar a la próxima etapa de investigación las cepas: L6, L31, L34, L42, L24 y L13. Estas son coincidentes en los tres estudios realizados. La cepa L36 y la L32 fueron excluidas para la próxima fase porque son las peores en cuanto a producción de ácidos y la L131 por no mostrar buenos halos frente al patógeno apícola. Las restantes no resaltaron en las características *in vitro* investigadas.

#### **3.2.4- Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* spp.**

La transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino es un problema de salud importante; por lo tanto, es deseable que los microorganismos probióticos sean sensibles a los antibióticos prescritos comúnmente en baja concentración o que la resistencia que exhiban sea

inherente al microorganismo y no haya riesgo de transferencia de genes de resistencia (Lee *et al.*, 2012).

Las cepas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos probados y se observó resistencia en diferente grado para los antibióticos: Aztreonam, Fosfomicina, Kanamicina y Neomicina. Los resultados obtenidos para cada una de las cepas empleadas en el estudio se muestran en la tabla 4 (ver Anexo 2).

La ausencia de resistencias adquiridas a antibióticos es uno de los primeros criterios de seguridad que se deben controlar en los candidatos a probióticos. Se ha descrito que las bacterias lácticas presentan resistencia a la amikacina, oxacilina y vancomicina. Muchas veces los mecanismos no son transferibles y se considera para el género de *Lactobacillus* como resistencia intrínseca. Es importante evaluar si la resistencia a antibióticos encontrada en algunas BAL se debe a elementos móviles o a elementos cromosomales, en cuyo caso no presentarían riesgos (Sánchez *et al.*, 2015).

**Tabla 4.** Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a 18 antibióticos.

Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.						
Antibióticos	L6	L13	L24	L31	L34	L42
AMP	S	S	S	S	S	S
AMS	S	S	S	S	S	S
ATM	R	R	S	R	R	R
AUG	S	S	S	S	S	S
BACIT	S	S	S	S	S	S
CFT	S	S	S	S	S	S
CIOR	S	S	S	S	S	S
DXT	S	S	S	S	S	S
E	S	S	S	S	S	S
FEP	S	S	S	S	S	S
FOS	R	R	R	S	S	R
K	S	S	R	R	R	R
NEOMY	S	S	S	R	R	S
OX	S	S	S	S	S	S
P	S	S	S	S	S	S
PRL	S	S	S	S	S	S
RIFAM	S	S	S	S	S	S
TE	S	S	S	S	S	S

S: susceptible; R: resistente.

Dentro los antibióticos investigados por Elzeini *et al.* (2021) se encuentran dos grupos de antibióticos categorizados por sus mecanismos: inhibidores de la síntesis de la pared celular (ampicilina y vancomicina) e inhibidores de la síntesis de proteínas (cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina). Los resultados revelaron que los aislados probados eran sensibles al cloranfenicol, ciprofloxacina y tetraciclina. La resistencia se presentó para kanamicina y ampicilina, efecto que es similar al detectado en este estudio sólo para el primer antibiótico.

Gharehyakheh *et al.* (2017) realizó un estudio sobre resistencia a antibióticos convencionales utilizados en medicina, de cinco cepas de BAL aisladas del estómago de la abeja melífera (*L. fermentun* (HM027462), *L. kunkeei* (GQ451631), *L. pentosus* (HM027640), *Lactobacillus* Taj Naser-1 (GQ451611), *Lactobacillus* ssp. Taj Makhdzir-Naser-1 (GQ451633). Se reportan en la mayoría de ellas niveles de sensibilidad a ampicillin, cloranfenicol, eritromicina y penicilinas datos similares a los encontrados en el presente trabajo.

### 3.2.5- Hidrofobicidad.

En la tabla 5 se aprecian los resultados de la hidrofobicidad de las cepas evaluadas. Se comprobó que todas presentan clasificación alta frente al xileno a excepción del tolueno, donde L34 alcanzó una clasificación media.

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de hidrofobicidad de las diferentes cepas con xileno y tolueno como solventes orgánicos. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas según Prueba de Turkey HSD ( $p < 0,001$ ).

Cepa	Xileno	Tolueno
L6	99,86 <sup>a</sup>	99,14 <sup>a</sup>
L13	99,47 <sup>a</sup>	99,06 <sup>a</sup>
L24	98,26 <sup>a</sup>	99,85 <sup>a</sup>
L31	95,3 <sup>b</sup>	98,07 <sup>a</sup>
L34	67,82 <sup>c</sup>	34,79 <sup>c</sup>
L42	99,36 <sup>a</sup>	55,3 <sup>b</sup>
P	0,001	0,001
EE	1,33	1,67

Alta: (51-100%) Media: (30-50%) Baja: (0-29%)

Se plantea que existe una correlación entre la habilidad por la adhesión y la hidrofobicidad de algunos *Lactobacillus* spp. La naturaleza hidrófoba de la superficie más externa de los microorganismos se relaciona con la unión de las bacterias al tejido del huésped; esta propiedad podría conferir una ventaja



competitiva, importante para el mantenimiento bacteriano en el sistema gastrointestinal (Tuo *et al.*, 2013; Krausova *et al.*, 2019).

La hidrofobicidad celular es una estimación indirecta de la adhesión y colonización exitosa de los probióticos, por consiguiente, su evaluación permite caracterizar la capacidad de la superficie de las cepas, para interactuar con la mucosa y las células del intestino (Falah *et al.*, 2019).

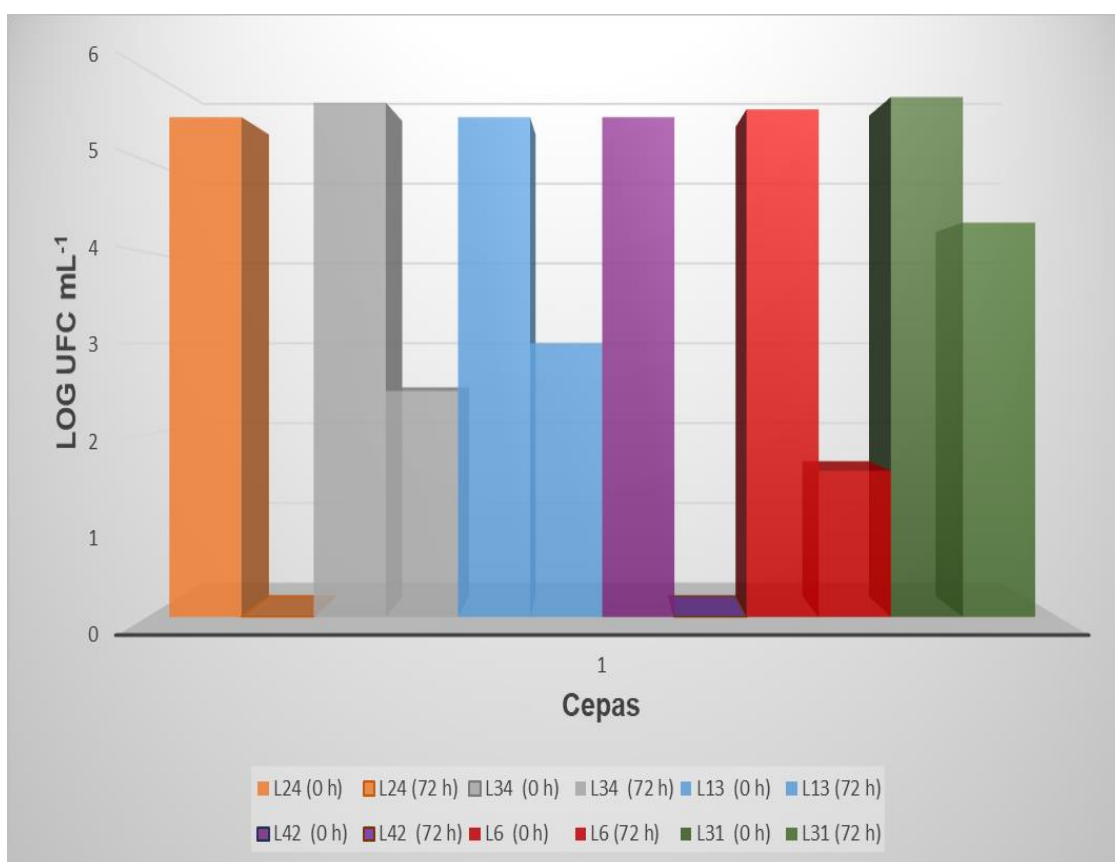
La capacidad de adherirse a la mucosidad producida por el epitelio intestinal es uno de los principales criterios para la selección de probióticos. Tener esta capacidad puede aumentar sus posibilidades de supervivencia en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, permitir que las bacterias ejerzan sus efectos positivos para la salud (Okochi *et al.*, 2017). Aunque la capacidad de adhesión de las bacterias probióticas no garantiza necesariamente un beneficio para la salud, su unión al epitelio intestinal puede tener un papel protector contra las bacterias dañinas a través de la competencia por los sitios de unión de la célula huésped (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). Se pudo comprobar que las cepas L6, L13, L24 y L31 tienen una alta hidrofobicidad, por lo que se deduce que estas tienen mayores posibilidades de adherirse a la mucosa intestinal.

Falah *et al.* (2019) refieren que el examen de hidrofobicidad puede considerarse una prueba previa de la capacidad de adhesión de las bacterias probióticas a las células epiteliales. También confirman que la hidrofobicidad es una de las propiedades importantes que mejoran el primer contacto entre las bacterias y las células huésped.

### **3.2.6- Resistencia osmótica al jarabe**

*A. mellifera* consume altas concentraciones de azúcares a través del néctar y la miel que adquiere durante su dieta. En Cuba en los meses de agosto a septiembre (correspondiente al período de hambruna), los apicultores le suministran a las abejas un jarabe con azúcar de caña para su sostenimiento, en concentraciones de 1000 g/L. Por ambos motivos es importante que los microorganismos a emplear en el diseño de productos en base a probióticos para abejas, tengan la capacidad de sobrevivir en estas condiciones, pues ellos son introducidos en el alimento.

Se evaluó la supervivencia de los diferentes aislados durante 72 horas de incubación a una temperatura de 30°C en dos jarabes con diferentes concentraciones 1000 g/L y 2000 g/L (figura 6). Las concentraciones iniciales para cada una de las cepas fue 5 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Al transcurrir este tiempo, los aislados que pudieron resistir a la concentración 1000 g/L fueron: L-31, L-13, L-34 y L-6. De ellos L-31 fue la que alcanzó mayor viabilidad pasado este tiempo obteniéndose un crecimiento en el orden de 4 Log UFC mL<sup>-1</sup>. Para el jarabe cuya concentración fue de 2000g/L no se observó crecimiento en ningún caso.



**Figura 6.** Resistencia osmótica al jarabe (1000g/L) por las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. a las 0 y 72 horas.

Estos resultados son superiores a los informados por Audisio & Benitez - Ahrendts (2011) quienes evaluaron la supervivencia de una cepa de *Lactobacillus johonsonii* a concentraciones de azúcar de 125g/L, 250g/L y 500g/L. Estos autores observaron que la cepa no perdía viabilidad a las 24h al

ser incubada en 125 g de azúcar/L, mientras que, en concentraciones de azúcar superiores no había crecimiento (500 g/L) o se veía muy disminuido (250g/L).

Máchová *et al.* (1997) analizaron la supervivencia de 5 aislamientos de bacterias del ácido láctico de distintos orígenes en 500g de azúcar/L. Luego de 72h a 28°C observaron que el número de microorganismos se redujo entre uno y dos órdenes de magnitud.

Resultados superiores fueron alcanzados por Arredondo (2015) quien evaluó la supervivencia de los aislamientos a dos concentraciones de azúcar (1000g/L y 2000g/L) y dos temperaturas (28°C y 4°C). La mayoría de los aislamientos fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones utilizadas. Debido a la viscosidad de los jarabes utilizados en estos ensayos, se debe mantener particular cuidado al homogeneizar las suspensiones para que sea reproducible. En este caso no se observaron diferencias en la supervivencia de los microorganismos entre las distintas concentraciones de azúcar, aunque si se detectó una mayor supervivencia de los aislamientos incubados durante 72h a 4°C. Esto indicaría que los apicultores podrían preparar el jarabe con el probiótico 3 días antes y almacenarlo a 4°C hasta 3 días antes de utilizarlo.

### **3.3- Valoración económica, social y ambiental de bacterias con capacidad probióticas en la apicultura.**

El impacto económico de la aplicación de bacterias probióticas en la apicultura puede ser significativo a largo plazo. Se utilizan para mejorar la salud y el rendimiento de las abejas, lo que a su vez puede conducir a una mayor producción de miel y un menor riesgo de enfermedades en las colonias (Flores *et al.*, 2018)

El uso de estos microorganismos puede mejorar la salud de estos insectos, lo que puede resultar en una mayor longevidad y capacidad para recolectar néctar y polen. Esto puede llevar a un aumento en la producción de miel, lo que a su vez puede generar mayores ingresos para los apicultores (Vásquez *et al.*, 2012). Reduce el riesgo de enfermedades en las colonias las cuales tiene un impacto significativo en la productividad y se traducen en pérdidas económicas para los apicultores. Al reducir este riesgo, ayudan a mantener la salud y garantizan una producción constante de miel.

Los biopreparados reducen la necesidad de utilizar productos químicos lo que resulta en ahorros significativos para los apicultores, ya que estos insumos suelen ser costosos y pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente (Alberoni *et al.*, 2016)

# Conclusiones

## CONCLUSIONES

- Se aislaron un total de 13 cepas con características morfológicas, bioquímicas y tintoriales distintivas del género *Lactobacillus* spp.
- Después de la caracterización *in vitro* de las cepas estudiadas en cuanto a capacidad de crecimiento, producción de ácidos orgánicos, actividad antimicrobiana frente a *P. larvae*, susceptibilidad antimicrobiana a 18 antibióticos, hidrofobicidad y resistencia osmótica al jarabe, las mejores candidatas a probióticos fueron: L31, L13, L34 y L6.

# Recomendaciones

## RECOMENDACIONES

- Identificar por técnicas de biología molecular los aislados seleccionados.
- Realizar otras pruebas *in vitro* como: producción de sustancias antimicrobianas, tolerancia a la acidez, toxicidad y sensibilidad a diferentes temperaturas, para completar el perfil probiótico de los microorganismos estudiados.
- Evaluar *in vivo* el efecto de los biopreparados que se obtengan de estos microorganismos.



# Referencias Bibliográficas

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abushelaibi, A., Almahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N., Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Science and Technology*. 79. Doi 10.1016/j.lwt.2017.01.041
2. Alayande, K. *et al.* 2020. Probiotics in Animal Husbandry: Applicability and Associated Risk Factors. *Sustainability* [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/su12031087> [Consulta: 03 junio 2023].
3. Alberoni, D.; Gaggia, F.; Baffoni, L.; Di Gioia, D. Beneficial Microorganisms for Honey Bees: Problems and Progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 9469–9482. [CrossRef]
4. 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. *J. Apicult. Res.* 59 (5):825833, DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1706912>
5. Alqarni, A. S., Owayss, A. A., Mahmoud, A. A., Hannan, M. A. 2018. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *J Saudi Chem Soc.* 18(5):618–25. Available Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312001767>
6. Álvarez, J. L. 2014. Productores de polinizadores. *Revista de la Asociación Cubana de Producción Animal*. 38–39p.
7. 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*. 129-131p. doi: 10.1016/j.jip.2012.02.008.
8. APICUBA. 2021. Informe-Resumen balance de trabajo 2021 y objetivos 2022. La Habana: Ministerio de la Agricultura. 132p. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0252-85842023000200014&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0252-85842023000200014&nrm=iso).
9. Arredondo, D. 2015. Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas melíferas. [en línea]. Tesis de maestría. Universidad de la República

- (Uruguay). Facultad de Ciencias. PEDECIBA. [Fecha consulta: 5 de diciembre 2023]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/26659>
10. Arredondo, D.; Castelli, L.; Porrini, M. P.; Garrido, P. M.; Eguaras, M. J.; Zunino, P. *et al.* 2018. Lactobacillus kunkeei strains decreased the infection by honey bee pathogens Paenibacillus larvae and Nosema ceranae. *Benef. Microbes*. 9 (2):279-290. DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2017.0075>.
  11. 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(1):29–34. Doi: <https://doi.org/10.3920/BM2010.0024>
  12. Bał-Badowska, J. *et al.*, 2019. The Role and Significance of Stingless Bees (*Hemiptera: Apiformes: Meliponini*) in the Natural Environment. *Sciendo*. Doi: <https://doi.org/10.2478/oszn-2019-0005>
  13. Barros, C., María, V. 2018. Uso de probióticos en la alimentación de pollos broiler con diferente porcentaje de inclusión. [En línea] (Trabajo de Titulación). (Medica Veterinaria Zootecnista), Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cuenca.37 p. [Consulta: 2023-01-07]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16316/1/UPS-CT007940>
  14. Bauer, A., Kirby, M., Sherris, J. & Turck, M: 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Patholog.* 45:493-496
  15. Biesmeijer, J. 1997. Abejas sin aguijón: su biología y la organización de la colmena. Holanda: Elinkwijk BV, Utrecht3577 p. ISBN 9039317046, 9789039317044.
  16. Bottacini, F., Milani, C., Turrone, F., Sanchez, B., Foroni, E., Duranti, S., Serafini, F., Viappiani, A., Strati, F., Ferrarini, A. 2012. Bifidobacterium asteroides PRL2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut. *PLoS ONE*, 7(9): 44229. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044229>
  17. Camargo, J.M.F. 1996. Meliponini neotropicales: o gênero camargoia moure (apidae, apinae, hymenoptera,). *Arquivos de Zoologia*, 33(2):71-92. Doi: <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7793.v33i2-3p71-92>.

18. Cerqueira, A. E. S., Hammer, T. J., Moran, N. A., Santana, W. C., Kasuya, M. C. M., & da Silva, C. C. 2021. Extinction of anciently associated gut bacterial symbionts in a clade of stingless bees. *The ISME journal*, 15(9): 2813–2816. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01000-1>
19. Crane, D. 1992. The production of culture in the music industry: The ASCAP-BMI controversy. *Social Problems*, 39(1): 11-22. ISBN: 9780803936935
20. Diaz, J. A., & Mizota, K. 2019. The role of the microbiome in immunologic development and its implication for pancreatic cancer immunotherapy. *Gastroenterology Report*, 7(1):3-5. Doi: <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>
21. Díaz, S., de Souza Urbano, S., Caesar, L., Blochtein, B., Sattler, A., Zuge, V., & Haag, K. L. 2017. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of invertebrate pathology*, 143, 35–39. Doi <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.012>.
22. Elzeini, H. M., Ali, A. R., Nasr, N. F., Elenany, Y. E., & Hassan, A. 2021. Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. *Journal of Apicultural Research*, 60(2), 349-357. DOI: [10.1080/00218839.2020.1746019](https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1746019)
23. Engel, S. G., Wonderlich, S. A., Crosby, R. D., Mitchell, J. E., Crow, S., Peterson, C. B., Le Grange, D., Simonich, H. K., Cao, L., Lavender, J. M., & Gordon, K. H. 2013. The role of affect in the maintenance of anorexia nervosa: evidence from a naturalistic assessment of momentary behaviors and emotion. *Journal of abnormal psychology*, 122(3): 709–719. Doi : <https://doi.org/10.1037/a0034010>.
24. Falah, F., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Moradi, S., Mortazavi, S. A., & Roshanak, S. 2019. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microbial Pathogenesis*, 131, 246–253. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.04.006>
25. FAO (The State of World Fisheries and Aquaculture, SOFIA). 2020. [En línea]. Rome, Italy: FAO, 2020 [Fecha de consulta: agosto 2020]. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229es> ISBN: 978-92-5-132756-2.

26. Fernández, S., Grajales, J., Rincón, M., Corone, R., Vázquez, A. 2020. Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee honey *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Revista Bio Ciencias* 7: 79. Doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e979>
27. Florencia, A. A., Gómez, J. S. & Salomón, V. 2018. Potencial probiótico de cepas de *Bacillus* aisladas de miel y polen de Tucuman. XXVI Jornada de Jóvenes Investigadores. Universidad Nacional del Guayo, Argentina. Doi: <http://bdigital.uncu.edu.ar/13082>.
28. Fonte-Carballo, L. *et al.* 2022. Base alimentaria y estado de salud en colmenas de dos meliponarios de Matanzas y Mayabeque, Cuba. *Pastos y Forrajes* [online]., vol.44 [citado 2023-12-07], eE11. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942021000100011&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942021000100011&lng=es&nrm=iso) . ISSN 0864-0394.
29. Forsgren, E., Olofsson, TC, Vázquez, A. *et al.* 2010. Nuevas bacterias del ácido láctico que inhiben las larvas de *Paenibacillus* en las larvas de abejas melíferas. *Apidologie* 41:99-108. Doi: <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>.
30. Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi I, Sequeira G, Marti LE, Rosmini MR. Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*. 2006;5. /srv-new/scielo/www/htdocs/scielo.php
31. Galarza, L. J. M. 2012. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. [en línea] 2012 [Fecha consulta: 5 de diciembre 2023]. Doi: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11242>
32. Garibaldi, L. A., Bartomeus, I., Bommarco, R., Klein, A. M., Cunningham, S. A., Aizen, M. A., *et al.* 2015. Trait matching of flower visitors and crops predicts fruit set better than trait diversity. *J. Appl. Ecol.* 52:1436-1444. Doi: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12530>.
33. Genaro J.A. & Loriga W. 2018: *Melipona beecheii* Bennett (*Hymenoptera: Apidae*): origen, estudios y meliponicultura en Cuba. *Insecta Mundi* 0643: 1-18. Doi: <https://journals.flvc.org/mundi/article/view/0643>.

34. Genaro, J. A. 2006. A history of systematic studies of the bees of Cuba (*Insecta: Hymenoptera, Anthophila*). Zootaxa 1195(1195):39-601195. ISSN 1175-5326.
35. Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M., Fridlund, B 1994. Monitoreo de patrones de comportamiento de organismos acuáticos con una técnica de conversión de impedancia. Medio Ambiente Internacional.(20) 2:209-219p, ISSN 0160-4120. Doi [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0160-4120(94)90138-4).(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0160412094901384>)
36. Gerhardt, A., Svensson, E., Clostermann, M., Fridlund, B. 1994. Monitoreo de patrones de comportamiento de organismos acuáticos con una técnica de conversión de impedancia. Medio Ambiente Internacional. (20) 2:209-219p, ISSN 0160-4120, Doi: [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0160-4120(94)90138-4).<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0160412094901384>.
37. Gharehyakheh S, HosseinElhamirad A, Nateghi L, Varmira K. 2017. Evaluation of resistance to conventional antibiotics in medicine by 5 strains of Lactic Acid Bacteria isolated from the stomach of honey bee. Asian Journal of Biological and Life Sciences.;6(3).
38. Guzmán, D., 2022. Diversidad morfológica y genética de *Tetragonisca angustula* (*Hymenoptera: Apidae*) en Cundinamarca, Colombia. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81692>.
39. Harrigan, W. F. & McCance, Margaret E. Métodos de laboratorio de Microbiología. León, España: Editorial Academia, 1968.
40. Hernández, B.E., Aguirre, E., Prado, A., Koh, G., & Lobato, C. 2020. Actividades antioxidante e inhibitoria de la ECA de hidrolizados obtenidos a partir de proteínas de lupino y haba mediante hidrólisis enzimática y fermentación. Ingeniería agrícola y biosistemas, 12(2):99-114. <https://doi.org/10.5154/r.inagbi.2020.02.020>
41. 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.

42. Imani Baran, A., Kalami, H., Mazaheri, J., & Hamidian, G. 2022. *Vairimorphaceranae* was the only detected microsporidian species from Iranian honey bee colonies: a molecular and phylogenetic study. *Parasitology research*, 121(1):355–366. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07381-8>
43. Killer, J., Dubna, S., Sedlacek, I., Svec, P. 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an in vitro inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 152–157. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.053033-0>
44. Koch H, Abrol DP, Li J, Schmid-Hempel P. 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Mol.Ecol.*22:2028–44.
45. Krausova, G., Hyslova, I., Hynstova, I. 2019. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation*. 5(4):100. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040100>.
46. Kwong, W.K. et al. 2017. Bacterial Communities and Social Behavior in Bees and Wasps. *Annual Review of Entomology*, 62, 605-626. doi: 10.1146/annurev-ento-031616-034955.
47. Kwong, W.K., Moran, N. A, 2016. Gut microbial communities of social bees, *Nat Rev Microbiol* 14(6): 374–384. DOI: <https://doi.org/doi:10.1038/nrmicro.2016.43>
48. Lamei, S. 2018. The effect of honeybee-specific lactic acid bacteria on American foulbrood disease of honeybees Lund: Lund University, Faculty of Medicine.
49. Lee, S.H., Yang, J., Goddard, M.E., Visscher, P.M., Wray, N.R. 2012 Estimation of pleiotropy between complex diseases using single-nucleotide polymorphism-derived genomic relationships and restricted maximum likelihood, *Bioinformatics*, Volume 28, Issue 19, Pages 2540–2542, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts474>.
50. 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 for parasitology*, 48(6): 433–444. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.004>.

51. Lilly, D.M. & Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci.* 147:747-748.
52. Lóriga, W., Álvarez, D., Fonte, L., Demedio J. 2015. Población inmadura y reservas de alimentos en colonias naturales de *Melipona beecheii* Bennett (*Apidae: Meliponini*) como factores básicos para su salud. *Revista De Salud Animal*, 37(1), 47. pp. 47-51. Disponible en: <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/537/492>
53. Lozada, A. E. 2001. The potential of the manipulation of intestinal flora by dietary means on human health. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 21(3), 106114.
54. Machado, J. A. M.; Ward, D. C.; Sánchez, A. Á.; Placeres, J. P. G. & Reyes, R. D. R. 2019. Población de crías y reservas de alimentos en colmenas racionales de *Melipona beecheii* Bennett como factores básicos para su salud. *Revista Científica Agroecosistemas*. 7 (3):128-133. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/327>
55. Markowiak, P. & Śliżewska, K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and symbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* 10:21. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
56. Martín, Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, A., et al. 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 13021329.
57. Mathialagan, M. et al. 2018 . Isolation, Characterization and Identification of Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) from Honey Bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7. 894-906. 10.20546/ijcmas.2018.704.096.
58. Mathialagan, Y., Edward, P. M., Senthilkumar, M. R., Srinivasan, S. Mohankumar, S. 2018 Isolation, characterization and identification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 7 (4): 894-906. Doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096>



59. May, W., Lóriga, W., De la Rúa, P. 2019. A genetic and morphological survey to trace the origin of *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini) from Cuba". *Apidologie*. Vol. 50, pp. 859–870. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00696-7>
60. Michener, C. D. 2013. The Meliponini. In: P. Vit, S. R. M. Pedro and D. W. Roubik, eds. *Pot-honey a legacy of stingless bees*. New York: Springer. 3-17p.
61. MINAG. 2015. Lineamientos de la Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar para el año 2015. P. 53–54 In: Grupo Nacional de la Agricultura Urbana, Suburbana y Familiar. INIFAT; La Habana, Cuba. 133 p.
62. MINAGRI. 2022 Anteproyecto de Ley de Ganadería. La Habana: Ministerio de la Agricultura. 39 p.,
63. Ministerio de Justicia. 2021. Decreto-Ley No. 31 de Bienestar Animal. *Gaceta Oficial (Extraordinaria)* No. 25. p. 399-424. La Habana: Ministerio de Justicia. <https://www.tsp.gob.cu/sites/default/files/documentos/goc-2021ex25>.
64. Mockler BK, Kwong WK, Moran NA, Koch H. 2018. Microbiome structure influences infection by the parasite *Crithidia bombi* in bumble bees. *Appl Environ Microbiol*. 84:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01000-1>
65. Molina A. 2019. Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agron Mesoam* [Internet]. [citado 27 de julio de 2023];30(2):601-11. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S165913212019000200601&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S165913212019000200601&lng=en&nrm=iso&tlng=es).
66. Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>
67. Mudroňová, D.; Toporčák, J.; Nemcová, R.; Gancarčíková, S.; Hajdučková, V., Rumanovská, K. 2011. *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *J. Apicult. Res.* 50 (4):323-324. DOI: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.4.11>

68. Noël, A., Le Conte, Y., & Mondet, F. 2020. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it?. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(1), 45-57.
69. Nurdjannah, N. *et al.* 2020). Lactic Acid Bacteria from Honey Bees Digestive Tract and Their Potential as Probiotics. Doi: 10.2991/absr.k.200513.041.
70. Okochi, M.; Sugita, T.; Asai, Y.; Tanaka, M.; Honda, H. 2017. Screening of peptides associated with adhesion and aggregation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro. *Biochem. Eng. J.* 128:178–185p.
71. OMS. 2022. Resistencia a los antimicrobianos. Oficina regional para las Americas de la organización mundial de la salud. <https://www.paho.org/es/temas/resistenciaantimicrobianos>
72. Paguay, C. & Pintado, M. 2023. Evaluación del efecto del uso del kéfir y miel de abeja como suplemento alimenticio en la dieta de pollos de engorde. UTC. Latacunga. 125 p. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/10929>
73. Parker, R.B. 1974. Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Animal Nutr. Health.* 4-8p.
74. Pasupuleti, V.R.; Sammugam, L.; Ramesh, N.; Gan, S.H. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 2017, 1259510. [CrossRef]
75. Peng T, Schroeder M, Grüter C. 2020. Octopamine increases individual and collective foraging in a neotropical stingless bee. *Biol. Lett.* 16(6):20200238. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>
76. Pérez, A. 2017. La apicultura en Cuba y su situación actual. *Agroecología* 12 (1): 67-73. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/330361>
77. Pérez-Piñeiro, A. 2017. La apicultura en Cuba y su situación actual. *Agroecología.* 12 (1):67-73. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/330361>.
78. Poey, F. 1851. Historia de la abeja de la tierra *Trigona fulvipes*. p. 122-176. In: *Memorias sobre la historia natural de la isla de Cuba, acompañadas de sumarios latinos y extractos en francés.* Tomo I. Imprenta de Barcina; La Habana. 544 p.

79. Quezada J., Carrillo A. 2001. Estudio preliminar sobre la R variabilidad morfológica de *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini) en su rango de distribución de México, América Central y el Caribe". Memorias del II Seminario Mexicano sobre Abejas sin Aguijón. 73-78 pp.
80. Quezada, J. J. G. 2018. "Taxonomy and diversity of the stingless bees," in *Stingless Bees of Mexico* (Mexico City). p. 1–40. Doi: 10.1007/978-3-319-77785-6\_1.
81. Ramírez J.C., Rosas P., Velázquez M., Ulloa J.A., Arce F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia los alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año* 2. Vol 7. Recuperado <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/31697/38344>. *Revista MVZ Universidad de Córdoba*. 15, (1), 1944-1953 pp.
82. Rodríguez, J. A., Hernández, J. E., Frizzo, S., Fernández, K., Sánchez, L., & Solenzal Valdivia, Yovanni. 2021. Caracterización in vitro de propiedades probióticas de *Lactobacillus* ssp. aislados del tracto digestivo de abejas. *Revista de Salud Animal*, 43(2), e07. Epub 09 de agosto de 2021. Recuperado en 06 de diciembre de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2021000200004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2021000200004&lng=es&tlng=es)
83. Root, A. I. 1903. Notes of Travel. Stingless bees, and bees in log hives in Cuba. *Gleanings in Bee Culture* 31: 109–110.
84. Rothman, J.A., Leger, L., Graystock, P., Russell, K., McFrederick, Q.S. 2019. The bumble bee microbiome increases survival of bees exposed to selenate toxicity. *Environ Microbiol.* 21:3417–29.
85. Sanchez, L. *et al.* 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev Salud Anim.* [online]., vol.37, n.2 [citado 2023-12-06], pp.94-104. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2015000200004&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2015000200004&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0253-570X.

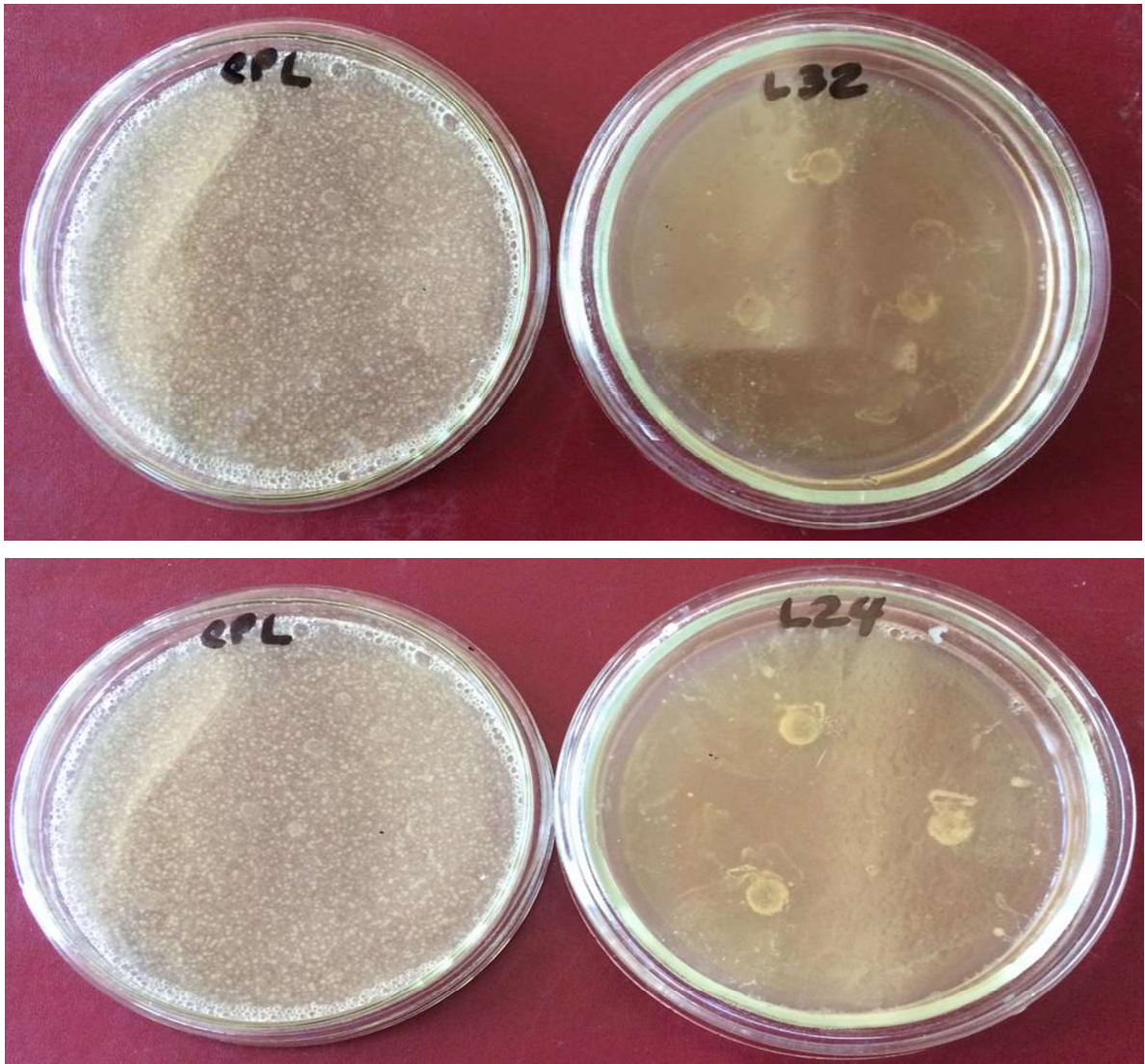
86. Santos, E. & Col, M. 2016. Aislamiento y caracterización de cepas probióticas del tracto digestivo de la abeja *Melipona beecheii*. *Revista de Investigación Microbiológica*, 10(2), 45-52. DOI: 10.1234/rim.2016.10.2.45
87. Schillinger, U., & Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1901–1906. <https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989>
88. Solmaz, H., Muz, D., Muz, M. N. 2021. Bal arılarının (*Apis mellifera*) bakteriyel hastalıkları, tanı ve tedavi. Özdemir N, editör. *Veteriner Arı Sağlığı ve Apiterapi*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri.37-47p.
89. Somerford, F. N. 1902. The Tariff; Reduction on sugar; stingless bees. *Gleanings in Bee Culture* 30:592-593.
90. Stephan, J.G., de Miranda, J.R., & Forsgren, E. 2020. American foulbrood in a honeybee colony: sporesymptom relationship and feedbacks between disease and colony development. *BMC ecology*, 20(1), 1-14.
91. Thoman, M. L. 2023. ExpertoAnimal. Partes de la abeja [artículo web]. ExpertoAnimal, s. a. Disponible en: la página web actual. [29 de noviembre de 2023].
92. Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of dairy science*, 96(7): 4252-4257. Doi <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
93. Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., et al. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*. 7, 3. doi: 10.1371/annotation/3ac2b867-c013-4504-9e06-bebf3fa039d1.
94. Vásquez, M. 2014. Abejas meliponas en Cuba. *Vida Apícola*. Publicación de Apicultura de Montagud Editores. p 2.
95. Verde, M. & Bande M.J. 2017. Principales Enfermedades de la abeja melífera. Medidas de Lucha y Control. <https://www.portalfruticola.com/noticias/agrotecnia/las-principales-enfermedades-de->

[lasabejas/#:~:text=Loque%20americana%3A%20Es%20una%20enfermedad%20grave%20de%.](#)

96. Wang, S., Lin, Z., Chen, G., Page, P., Hu, F., Niu, Q., Su, X., Chantawannakul, P., Neumann, P., et al. 2020. Reproduction of ectoparasitic mites in a coevolved system: *Varroa* spp. Eastern honey bees, *Apis cerana*. Ecology and Evolution, 10(24):14359-14371. <https://doi.org/10.1002/ece3.7038>
97. Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C. Inhibition of *Paenibacillus* larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. Journal of invertebrate pathology. 2013;112(1):62-67. in /srv-new/scielo/www/htdocs/scielo.php
98. Yuri S.T., Huang, W., Solter, L.S., Malysh, J.M., Becnel, J. J., & Vossbrinck, C.R. 2020. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. Journal of Invertebrate Pathology. Volume 169,107279, ISSN 0022-2011. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>.

# Anexos

**ANEXO 1.** Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* frente a *P. larvae*. CPL: Control, L32 y L24: cepas.





**ANEXO 2.** Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* spp frente a diferentes antibióticos.

