



UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
CENTRO DE ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS



*Efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico  
para la prevención de la Loque americana en *Apis  
mellifera* L.*

*Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias*

*Lic. Marlene María Martínez Mora, MSc.*

Matanzas

2025



**UNIVERSIDAD DE MATANZAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CENTRO DE ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS**



**Efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico para la prevención de  
la Loque americana en *Apis mellifera* L.**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autora: Lic. Marlene María Martínez Mora, MSc.

Tutora: Lic. Ana Julia Rondón Castillo, Dr. C.

Matanzas

2025

La culminación de esta etapa en la vida profesional, implica la participación de muchas personas que nos acompañaron a lo largo del camino.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres por mostrarme el camino correcto y el apoyo que me brindaron para lograr las metas profesionales que me propuse.

A mis hijos Marlon y Arlenys por su cariño y comprensión al prescindir de mis atenciones durante horas, días y hasta meses para cumplir este proyecto de vida.  
¡Gracias mis niños!

A mi esposo Arley por todo su apoyo durante estos años.

A mi tutora: la doctora Ana Julia Rondón Castillo por su guía, apoyo, entrega, amistad y confianza: ¡Gracias, gracias mil!!!

A la dirección de la Empresa Apícola de Matanzas, especialmente al Jefe de Producción Dr. MVZ. Alain Vega Cárdenas, al Especialista Principal Dr. C. Roger Rodríguez Jiménez y a su Director M.Sc. Rubén Jesús Lugo Tanquero por brindarnos sus conocimientos y ayudarnos con el suministro de abejas, cajas, miel, jalea real y financiamiento para el desarrollo de la parte experimental.

Al financiamiento del proyecto CITMA Territorial de Matanzas “Evaluación del efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico frente a agentes patógenos de *Apis mellifera* L.”.

A los colegas del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spiritus, Cuba (LARISA) por toda su colaboración en la donación de cepas patógenas de las abejas y aportes al conocimiento para el desarrollo de protocolos de trabajo con las abejas.

A los oponentes, miembros de los tribunales y todos los que se tomaron su tiempo en leer el documento y lo enriquecieron con sus aportes.

A mi familia del CEBIO, Marlen, Aymara, Martica, Madyu, Yunel, Camacho, Hectico, Leissy, Yasmery y Lizdeysi por los aportes al conocimiento, preocupación y amistad incondicional a lo largo del camino.

A los estudiantes que colaboraron en el desarrollo de los experimentos, Amanda, Roxana, Melissa, Elizabeth, Delia Rosa, Adriel, muchas gracias muchachos por todo su trabajo y aportes.

A los colegas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que me apoyaron en esta difícil tarea.

A **TODOS** los amigos que estuvieron siempre presentes y preocupados, gracias por su confianza y aportes en mi vida profesional.

*A mi familia y esposo por su apoyo incondicional*

*A mis hijos*

## Síntesis

En los apiarios se presentan microorganismos patógenos que provocan enfermedades en las abejas. Una alternativa al uso de antibióticos es la aplicación de probióticos que prevengan las infecciones en las colmenas. La investigación tuvo como objetivo, evaluar el efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico obtenido a partir de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B., para la prevención de la Loque americana en *Apis mellifera* L. Se realizó el aislamiento y selección de cepas con potencial probiótico, a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*, se formuló y optimizó un nuevo medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31 (MCL31) y se determinó su estabilidad a 4°C y a temperatura ambiente, se comprobó *in vitro* la seguridad de aplicación del biopreparado obtenido en abejas adultas y por último, se evaluó la actividad antimicrobiana del biopreparado *Lactobacillus* L31 frente al patógeno *Paenibacillus larvae*. Se demostró que *Lactobacillus* L31 exhibía las mejores características como candidata a probiótico. En el MCL31 se obtuvo una población microbiana  $>12$  Log UFC.mL<sup>-1</sup> y una estabilidad de 90 días a temperatura ambiente y refrigeración. Se evidenció la seguridad de aplicación del biopreparado en abejas adultas con aumento ( $p<0,001$ ) de la supervivencia (76,48% vs 73,46% control). *Lactobacillus* L31 mostró actividad antibacteriana *in vitro* frente a *P. larvae*, e *in vivo*, el biopreparado probiótico aumentó ( $p<0,001$ ) la tasa de supervivencia de las crías infectadas (52,50 vs 4,50% control). Se obtiene un biopreparado con potencial probiótico para la prevención de *P. larvae* en *A. mellifera*.

Palabras claves: actividad antimicrobiana, *Lactobacillus* spp., *Melipona beecheii* B., *Paenibacillus larvae*, potencial probiótico.

## Summary

Pathogenic microorganisms that cause diseases in bees are present in apiaries. An alternative to the use of antibiotics is the application of probiotics to prevent infections in hives. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial effect of a probiotic biopreparation obtained from *Lactobacillus* spp. from the digestive tract of *Melipona beecheii* B., for the prevention of American foulbrood in *Apis mellifera* L. The isolation and selection of strains with probiotic potential was carried out, from the digestive tract of *M. beecheii*, a new culture medium for the growth of *Lactobacillus* L31 (MCL31) was formulated and optimized and its stability was determined at 4°C and at room temperature, the safety of application of the biopreparation obtained in adult bees was verified *in vitro* and finally, the antimicrobial activity of the *Lactobacillus* L31 biopreparation against the pathogen *Paenibacillus larvae* was evaluated. *Lactobacillus* L31 was shown to exhibit the best characteristics as a probiotic candidate. In MCL31, a microbial population  $>12 \text{ Log CFU.mL}^{-1}$  was obtained, along with 90 days of stability at room temperature and under refrigeration. The safety of the biopreparation's application in adult bees was demonstrated, with an increase ( $p<0.001$ ) in survival (76.48% vs. 73.46% control). *Lactobacillus* L31 showed antibacterial activity *in vitro* against *P. larvae*, and *in vivo*, the probiotic biopreparation increased ( $p<0.001$ ) the survival rate of infected brood (52.50% vs. 4.50% control). A biopreparation with probiotic potential for the prevention of *P. larvae* in *A. mellifera* was obtained.

Keywords: antimicrobial activity, *Lactobacillus* spp., *Melipona beecheii* B., *Paenibacillus larvae*, probiotic potential.

## Índice

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1 Características biológicas e importancia de las abejas .....	5
1.1.1 Características generales de <i>Apis mellifera</i> L. ....	5
1.1.2 Características generales de <i>Melipona beecheii</i> B. ....	6
1.1.3 Comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas.....	7
1.1.4 Importancia de las abejas .....	9
1.2 Enfermedades que afectan a las abejas melíferas .....	10
1.2.1 Incidencia de la Loque americana en las abejas.....	12
1.3 Probióticos. Características generales .....	15
1.3.1 Concepto de probióticos. Principales microorganismos empleados como probióticos.....	15
1.3.2 Criterios de selección para cepas con potencial probiótico en abejas ...	16
1.3.3 Modo de acción de los probióticos en las abejas .....	17
1.4 Características del género <i>Lactobacillus</i> .....	21
1.5 Efectos de la aplicación de probióticos en abejas .....	22
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....	27
2.1 Material biológico y medios de cultivo .....	27
2.2 Conservación de cepas.....	28
2.3 Técnicas de cultivo y conteos de <i>Lactobacillus</i> spp. ....	28
2.4 Análisis químicos.....	29
2.5 Condiciones para el traslado de las abejas.....	29
2.6 Procesamiento estadístico .....	29
CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> spp. CON POTENCIAL PROBIÓTICO, A PARTIR DEL TRACTO DIGESTIVO DE <i>M. beecheii</i> .....	30
Introducción.....	30
Materiales y métodos específicos .....	30
3.1 Aislamiento de <i>Lactobacillus</i> spp. del tracto digestivo de <i>M. beecheii</i> .....	30
3.2 Caracterización y selección de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. como posibles candidatas probióticas.....	31
3.2.1 Determinación de la capacidad de crecimiento y producción de ácidos	31
3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a <i>Paenibacillus larvae</i>	32
3.2.3 Determinación de la hidrofobicidad .....	32
3.2.4 Determinación de la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos .....	33
3.2.5 Determinación de la resistencia osmótica al jarabe .....	33
3.2.6 Análisis estadístico.....	34
Resultados y discusión.....	34
Conclusiones parciales .....	43
CAPÍTULO 4. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus</i> L31 Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL BIOPREPARADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO. ....	44
Introducción.....	44
Materiales y métodos específicos .....	44
4.1 Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> L31 .....	44

---

4.1.1	Diseño del medio de cultivo y condiciones de fermentación .....	45
4.1.2	Diseño experimental.....	45
4.1.3	Procedimiento experimental.....	46
4.1.4	Análisis estadístico y decodificación de las variables .....	47
4.2	Estudio de la cinética de crecimiento y disminución del pH de la cepa <i>Lactobacillus</i> L31 en el nuevo medio de cultivo .....	47
4.2.1	Análisis estadístico.....	48
4.3	Estudio de la estabilidad del biopreparado bajo condiciones de almacenamiento.....	48
4.3.1	Diseño experimental y condiciones de cultivo del biopreparado .....	48
4.3.2	Análisis estadístico.....	49
	Resultados y discusión.....	49
	Conclusiones parciales .....	61
CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE APLICACIÓN DEL BIOPREPARADO DE <i>Lactobacillus</i> L31 EN ABEJAS ADULTAS ( <i>Apis mellifera</i> L.) A ESCALA DE LABORATORIO.....		63
	Introducción.....	63
	Materiales y métodos específicos .....	63
5.1	Elaboración del biopreparado. Cepa y condiciones de cultivo .....	63
5.2	Preparación del jarabe .....	64
5.3	Condiciones experimentales y tratamientos.....	64
5.4	Tratamientos y diseño experimental.....	65
5.5	Indicadores analizados.....	66
5.6	Análisis estadístico.....	67
	Resultados y discusión.....	67
	Conclusiones parciales .....	75
CAPÍTULO 6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>Lactobacillus</i> L31 FRENTE A <i>P. larvae</i> A ESCALA DE LABORATORIO. ....		76
	Introducción.....	76
	Materiales y Métodos específicos .....	77
6.1	Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> L31 frente a <i>Paenibacillus larvae</i> . ....	77
6.1.1	Método "Agar Spot".....	77
6.1.2	Ensayo de auto-agregación .....	77
6.1.3	Ensayo de co-agregación.....	78
6.1.4	Técnica de cultivos mixtos o co-cultivos.....	79
6.2-	Actividad antimicrobiana <i>in vivo</i> de <i>Lactobacillus</i> L31 en larvas de <i>A. mellifera</i> infectadas con <i>P. larvae</i> .....	80
6.3	Análisis estadístico.....	82
	Resultados y discusión.....	82
	Conclusiones parciales .....	91
	Consideraciones finales .....	93
CONCLUSIONES .....		99
RECOMENDACIONES .....		100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		102
ANEXOS .....		125

**Abreviaturas**

%	Por ciento
μL	microlitro
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
DE	Desviación Estándar
EE	Error estándar
FAO	Food and Agriculture Organization
g	gramo
GRAS	Generalmente reconocidas como seguras
h	hora
HELSc	Hidrolizado enzimático de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hidrógeno fosfato de potasio
L	Litro
mg	miligramo
min	minutos
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio
mL	mililitro
mm	milímetro
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de Manganeseo
MRP	Método de recuento en placas
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Probabilidad
PBS	Buffer fosfatado salino
QPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
TGI	Tracto Gastrointestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## Índice de tablas

	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Tabla 1	Criterios de selección preliminares para la determinación del potencial probiótico <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	35
Tabla 2	Hidrofobicidad de <i>Lactobacillus</i> spp. con xileno y tolueno como solventes orgánicos.	38
Tabla 3	Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	40
Tabla 4	Resistencia osmótica al jarabe de las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	41
Tabla 5	Formulación del medio MCL31.	45
Tabla 6	Niveles de azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) e inóculo a emplear en el diseño experimental.	46
Tabla 7	Matriz codificada y resultados del conteo de UFC.mL <sup>-1</sup> (transformados a LN) para el cultivo de la cepa <i>Lactobacillus</i> L31 según diseño compuesto central rotativo.	50
Tabla 8	Valores óptimos de cada variable en el medio de cultivo para el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> L31.	50
Tabla 9	Composición del medio de crecimiento para <i>Lactobacillus</i> L31 (MCL31).	51
Tabla 10	Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>Lactobacillus</i> L31 en los medios MRS y MCL31.	55
Tabla 11	Comportamiento de la mortalidad en los diferentes tratamientos durante el ensayo <i>in vivo</i> .	68
Tabla 12	Comportamiento de la tasa de supervivencia en los diferentes tratamientos durante el ensayo <i>in vivo</i> .	69
Tabla 13	Efecto de los diferentes tratamientos en el consumo de jarabe durante el ensayo <i>in vivo</i> .	75
Tabla 14	Porcentaje de auto-agregación y co-agregación mostrado por <i>Lactobacillus</i> L31 en el tiempo.	85
Tabla 15	Comportamiento del pH durante el crecimiento de las cepas en el co-cultivo.	86
Tabla 16	Mortalidad de las larvas en el ensayo de actividad antimicrobiana <i>in vivo</i> de <i>Lactobacillus</i> L31 frente a <i>P. larvae</i> a las 120 h.	87
Tabla 17	Análisis de varianza para la variable LN UFC.mL <sup>-1</sup> .	149

## Índice de figuras

	<b>Título</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Ciclo patogénico de <i>Paenibacillus larvae</i> .	13
Figura 2	Panales infectados por la bacteria <i>Paenibacillus larvae</i> . Opérculos perforados.	14
Figura 3	Regulación de la respuesta inmune en las abejas.	19
Figura 4	Modo de acción de las bacteriocinas.	20
Figura 5	Diagrama de la secuencia experimental desarrollada en el presente trabajo.	27
Figura 6	Influencia de los azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) y el inóculo en la variable respuesta LN UFC.mL <sup>-1</sup> de la cepa <i>Lactobacillus</i> L31.	50
Figura 7	Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> L31 en los medios MRS y MCL31.	53
Figura 8	Gráfico de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento en el medio MRS.	54
Figura 9	Gráfico de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento en el medio MCL31.	54
Figura 10	Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> L31 en el medio MRS y el MCL31.	56
Figura 11	Dinámica del comportamiento de la viabilidad celular del biopreparado <i>Lactobacillus</i> L31 durante su almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente.	59
Figura 12	Comportamiento del pH del biopreparado <i>Lactobacillus</i> L31 durante su almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente.	59
Figura 13	Cajas con panales de abejas utilizadas para la aplicación de los diferentes tratamientos.	64
Figura 14	Efecto de los diferentes tratamientos en los conteos de BAL del tracto digestivo de abejas adultas.	71
Figura 15	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> L31 frente a <i>P. larvae</i> a través del método de "Agar Spot".	83
Figura 16	Cinética de crecimiento durante el enfrentamiento de <i>Lactobacillus</i> L31 y <i>P. larvae</i> en el co-cultivo.	86
Figura 17	Comportamiento del porcentaje de supervivencia de larvas de <i>A. mellifera</i> infectadas con <i>P. larvae</i> tratadas con <i>Lactobacillus</i> L31 durante el experimento.	88
Figura 18	Metodología para la obtención de un biopreparado probiótico a partir de <i>Lactobacillus</i> spp. procedentes del tracto digestivo de <i>Melipona beecheii</i> .	148

# *Introducción*

## **INTRODUCCIÓN**

Las abejas son imprescindibles para el ciclo de vida en la tierra, pues son los principales agentes polinizadores de los cultivos comerciales y la flora salvaje de todo el mundo. Esta actividad asegura la biodiversidad, la salud de los ecosistemas y contribuye a la producción de alimentos en los sistemas agrícolas (Arredondo *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2024). De ellas también se puede obtener la miel y otros productos apícolas que se emplean en la industria alimentaria, cosmética y la medicina tradicional (Torres-Moreno *et al.*, 2021).

Actualmente, las abejas se enfrentan a numerosos desafíos como el cambio climático, 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. Las enfermedades más frecuentes detectadas en las colmenas son la varroosis causada por el ácaro *Varroa destructor*, la Loque americana (LA) provocada por la bacteria *Paenibacillus larvae*, la Loque europea y su agente causal *Melissococcus plutonius*, la nosemosis producida por el microsporidio *Nosema ceranae*, la presencia del pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*), diferentes virus ARN, entre otras infecciones (Arredondo *et al.*, 2018; Daisley *et al.*, 2020a).

La aplicación de antibióticos y acaricidas sintéticos para contrarrestar o minimizar estas enfermedades es una práctica limitada en muchos países, debido a las desventajas que poseen. Se conoce que estos tratamientos pueden causar un desbalance en la homeostasis entérica de estos insectos, lo que afecta su metabolismo y la respuesta inmune. Además, se estimula la aparición de genes de resistencia en microorganismos patógenos y la presencia de residuos de estas sustancias en los productos apícolas, lo cual constituye una amenaza para la salud humana (Hernández-García *et al.*, 2021).

Ante esta problemática, las investigaciones se centran en encontrar soluciones innovadoras para mejorar la salud de las abejas como la aplicación de probióticos,

microorganismos vivos que, al ser suministrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped (FAO/OMS, 2001). Estos aditivos zotécnicos pueden inhibir 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 (Molina, 2019).

Entre las bacterias que más se emplean como probióticos se destacan las del género *Lactobacillus*. Ellas se consideran microorganismos seguros, toleran las condiciones ácidas del tracto digestivo, pueden adherirse a las células del epitelio intestinal y producen sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas. Además, de forma natural colonizan el tracto digestivo de las abejas melíferas (Dengiz *et al.*, 2025).

La selección de microorganismos probióticos para abejas se basa en la utilización de diferentes criterios como: alta capacidad de crecimiento y de adhesión a las células intestinales, producción de sustancias antimicrobianas, resistencia a altas concentraciones de azúcares e inhibición de agentes patógenos *in vitro* como *P. larvae* (Adzuan *et al.*, 2022). La capacidad de inhibir a este microorganismo es muy importante, pues es el causante de la enfermedad más destructora para la cría de las abejas (LA) y provoca la muerte de colonias enteras. La LA carece de un tratamiento farmacológico eficaz, por lo que, cualquier estrategia de manejo sanitario, incluidos los probióticos, debe priorizar su control (Arredondo *et al.*, 2018).

En Cuba coexiste junto con *Apis mellifera* L. la abeja nativa *Melipona beecheii* B., la cual constituye el ganado meliponícola del país y se conoce como "abeja de la tierra" (Lóriga *et al.*, 2015). Esta especie representa un reservorio inexplorado de microorganismos con potencial probiótico, debido a la poca información existente sobre la composición microbiana de su tracto digestivo. El aislamiento y selección de lactobacilos con estas características a partir de este ecosistema se fundamenta por varias razones: *M. beecheii* posee un sistema inmunológico más resistente que *A. mellifera* y le permite responder de manera más efectiva al ataque

de microorganismos patógenos y parásitos, la miel que produce se reconoce por sus propiedades antimicrobianas, tiene un comportamiento más higiénico, lo cual influye en la escasa incidencia de infecciones y la microbiota presente en ella le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y alimenticias (Fernández-Roblero *et al.*, 2020; Adzuan *et al.*, 2022; El-Didamony *et al.*, 2024).

A partir de lo anteriormente planteado en la presente investigación se declaró el siguiente problema científico:

### **Problema científico**

En los apiarios se presentan microorganismos patógenos que provocan enfermedades en las abejas. Entre estos se encuentra *P. larvae*, causante de la Loque americana, una de las patologías más devastadoras de las colmenas. En la actualidad, la apicultura cubana no cuenta con aditivos probióticos que prevengan de forma natural estas infecciones en las crías de *A. mellifera*.

Para dar respuesta a esta problemática se propuso la siguiente hipótesis científica:

La obtención de un biopreparado probiótico con actividad antimicrobiana frente a *P. larvae*, elaborado a partir de lactobacilos procedentes del tracto digestivo de *M. beecheii*, constituirá una alternativa viable para contrarrestar los efectos de la Loque americana en las colmenas de *A. mellifera*.

Para aceptar o refutar la hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

- Evaluar el efecto antimicrobiano de un biopreparado probiótico, obtenido a partir de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *M. beecheii*, para la prevención de la Loque americana en *Apis mellifera* L.

### **Objetivos específicos**

- Obtener cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico, a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*.

- Optimizar un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de la cepa candidata a probiótica.
- Evaluar la seguridad de aplicación del biopreparado obtenido en abejas adultas (*A. mellifera*).
- Determinar a escala de laboratorio el efecto antimicrobiano del biopreparado probiótico frente a *P. larvae*.

#### **Novedades científicas**

- Se obtiene un biopreparado probiótico a partir de *Lactobacillus* L31 procedente de la microbiota del tracto digestivo de *M. beecheii*, con efecto antimicrobiano frente a *P. larvae*.
- Se informa la formulación de un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de *Lactobacillus* L31.

#### **Aportes científicos**

- Se propone una metodología para el aislamiento, caracterización y selección de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B. con potencial probiótico.
- Se informa el efecto de un biopreparado con actividad probiótica en la reducción de la infección de *P. larvae* en crías de *A. mellifera in vitro* y la evaluación de su seguridad de aplicación en abejas adultas.

# *Capítulo 1*

## **CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Características biológicas e importancia de las abejas**

#### **1.1.1 Características generales de *Apis mellifera* L.**

*A. mellifera* es un insecto de color pardo oscuro, con un tamaño aproximado de 1,5 cm en el caso de las obreras y 2 cm la reina y los machos. En la cabeza se encuentran dos ojos laterales compuestos de numerosas facetas y tres puntos brillantes en lo alto, que son ojos simples (ocetos). La boca es de tipo lamedor. El tercer par de patas en las obreras presenta unas cestillas para transportar el polen. El abdomen está visiblemente segmentado y las hembras poseen en el último anillo un aguijón venenoso que se queda fijado en la herida que produce, de manera que el insecto acaba muerto (Anon, 2017; Nowak *et al.*, 2021).

Viven en colonias muy numerosas que comprenden tres tipos de individuos. Los machos o zánganos de vida breve y en número limitado, que tienen función reproductora, las obreras que cumplen con la construcción de la colmena, la alimentación de larvas y el aprovisionamiento de víveres y la reina, que es la única hembra fértil, la cual presenta un abdomen muy largo y se dedica exclusivamente a la puesta de los huevos (Nowak *et al.*, 2021).

El sistema digestivo de las abejas adultas se divide en tres regiones principales: intestino anterior (estomodeo), intestino medio (mesenterón) e intestino posterior (proctodeo). Constituye un tubo continuo desde la boca hasta el ano, formado por los siguientes órganos: boca, faringe, esófago, buche y proventrículo, los cuales forman el estómago, seguido del ventrículo, el intestino delgado y el grueso. El buche de estas abejas, está muy desarrollado y se dilata con facilidad. Funciona como órgano de almacenamiento y transporte de néctar, agua y miel. En el intestino medio, ocurren los procesos bioquímicos de la digestión enzimática y la absorción de nutrientes. Los alimentos sufren la hidrólisis biológica para quedar reducidos a moléculas más simples, las que pueden ser absorbidas y utilizadas por las células. De esta manera, algunos

alimentos como la sacarosa, deben degradarse en su constitución química a componentes más sencillos, como la glucosa y la fructosa. Lo mismo sucede con los ácidos grasos y proteínas. En el intestino posterior, que comprende el íleon y el recto, ocurre la reabsorción de agua y electrolitos esenciales para garantizar la homeostasis (Anon, 2017).

### **1.1.2 Características generales de *Melipona beecheii* B.**

*M. beecheii* es una especie de "abeja sin aguijón" de gran importancia cultural y económica en Mesoamérica. Se distribuye principalmente en regiones tropicales que abarcan desde México hasta el sur de Sudamérica, adaptándose a diversos nichos ecológicos (Faleiros-Quevedo & Francoy, 2022).

Se caracterizan por su sociabilidad y la formación de colonias permanentes con una estructura social compleja, que incluyen una reina fértil, las obreras y el zángano (macho). Su tamaño es relativamente grande (8-15 mm de longitud), posee una morfología similar a abejorros o abejas melíferas, alas anteriores relativamente cortas y pelos largos en la parte superior del tórax y la cabeza. Tienen una coloración predominantemente negra y bandas amarillas en el abdomen. Producen reinas frecuentemente y son ligeramente más pequeñas que las obreras. Las celdas reales están mezcladas con las celdas de obreras y machos, la piquera es de barro. Al no poseer un aguijón funcional, se defiende a través de mordiscos y la secreción de sustancias irritantes (Fonte, 2022).

Se conocen como importantes polinizadores y principalmente en la producción de miel, la cual se considera un alimento de alta calidad por sus propiedades medicinales (antimicrobianas y antioxidantes) (Vit *et al.*, 2018). A diferencia de la miel de *A. mellifera*, la miel de *Melipona* es más líquida, ácida y rica en humedad. Las proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, elementos minerales y vitaminas también están presentes en la miel, pero solo en pequeñas concentraciones (Zulkhairi Amin *et al.*, 2023).

El sistema digestivo de *M. beecheii* está adaptado para la digestión y absorción de nutrientes, obtenidos principalmente del néctar, polen, y en algunas etapas larvales, de las secreciones glandulares de las obreras. Este sistema se divide en tres secciones principales igual que en *A. mellifera*: el intestino anterior (estomodeo), que es la porción más corta, se extiende desde la boca hasta el buche y es donde se almacena y transporta el néctar recolectado; el intestino medio (mesenterón) es el más largo y se extiende desde el buche hasta el intestino grueso, es donde se desarrolla la digestión enzimática y la absorción de nutrientes; y por último, el intestino posterior (proctodeo), compuesto por el íleon, el recto y las glándulas rectales, y es donde ocurre la reabsorción de agua, sales minerales y la eliminación de los desechos sólidos (Martins *et al.*, 2023).

### **1.1.3 Comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas**

La comunidad microbiana presente en el intestino de la abeja *A. mellifera* ha sido extensamente estudiada. Se caracteriza por la presencia de nueve grupos bacterianos dominantes. Estos son específicos de estos insectos y pueden transmitirse por interacciones sociales entre ellas (Kwong & Moran, 2016).

Los cinco grupos principales de bacterias son: grupo de bacterias Gram negativas (*Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apicola*), miembros del filo Proteobacterias, bacterias Gram positivas, Firmicutes (*Lactobacillus* Firm-4 y grupos de *Lactobacillus* Firm-5), filo Actinobacteria (*Bifidobacterium asteroides*), un pequeño número de especies de Proteobacterias (*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 coevolucionó y se diversificó con sus abejas hospedadoras. Esta comunidad es muy dinámica y adaptativa, ya que en su existencia influyen 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 (Kwong & Moran, 2016; Lamei, 2018).

La microbiota intestinal asociada a las abejas sin aguijón (tribu Meliponini) aún es objeto de investigación activa, especialmente en los últimos diez años. La información referente a este ecosistema es muy escasa con respecto a la existente para otras abejas sociales (Kwong, 2014). Según Cerqueira *et al.* (2021), existe la ausencia de determinados simbiositos en las abejas meliponas correspondientes a los géneros *Snodgrassella* y *Gilliamella*, los cuales pueden contribuir a la salud de las abejas melíferas y los abejorros. Esto se debe a que la abeja sin aguijón experimentó cambios ecológicos que las liberan de la dependencia de la nutrición o defensa basada en simbiositos.

Alternativamente, los miembros persistentes de la microbiota ancestral o los simbiositos recién adquiridos, pueden compensar la ausencia de estos géneros. *Melipona* conserva microorganismos pertenecientes a las familias características de las abejas melíferas como son: *Lactobacillaceae*, *Acetobacteraceae* y *Bifidobacteriaceae*. Estos microorganismos, en teoría, adquirieron nuevas funciones como capacidades metabólicas y protectoras. También asumieron nuevas asociaciones microbianas, como las cepas ambientales de *Lactobacillus*, *Floricoccus* 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 se asocian con este tipo de abeja. La composición de la microbiota intestinal puede variar según la edad, su dieta y las condiciones ambientales (Cerqueira *et al.*, 2021; Todorov *et al.*, 2024).

Estudios recientes realizados por Ramírez-Ahuja *et al.* (2025), analizaron la microbiota intestinal de 16 especies de abejas sin aguijón recolectadas en diferentes regiones de México. El análisis reveló que Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria son los filos bacterianos más abundantes entre estas especies de abejas. Dentro de los géneros dominantes, las bacterias ácido lácticas, como *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* y *Fructobacillus* spp., fueron las más prevalentes. Estas son responsables del desarrollo de funciones bioquímicas en

procesos metabólicos como la fermentación láctica y la biotransformación de compuestos orgánicos complejos en moléculas más fácilmente asimilables por las abejas. Además, actúan como probióticos, lo que ayuda a prevenir infecciones digestivas.

#### **1.1.4 Importancia de las abejas**

Las abejas melíferas (principalmente *A. mellifera*) son insectos sociales que colonizan con éxito numerosos ecosistemas en todo el mundo. Desempeñan un papel crucial en la polinización de plantas silvestres y cultivadas, con implicaciones sustanciales para la economía global y en los ecosistemas naturales donde garantizan la biodiversidad (Feketéné *et al.*, 2023). Se estima que 70 de los 107 cultivos más importantes que intervienen en la dieta humana dependen de estos polinizadores para su reproducción, los cuales representan entre el 40-50% (Arredondo *et al.*, 2018).

Los productos apícolas, en particular la miel, el propóleo y el veneno de abeja, son de creciente interés científico debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana. Ante la creciente resistencia a los antibióticos y las limitaciones de las terapias convencionales, las sustancias naturales derivadas de las abejas ofrecen una alternativa prometedora o un apoyo para el tratamiento de infecciones (Grinn-Gofroñ *et al.*, 2025).

En Cuba, la miel de abejas y sus derivados constituyen uno de los rubros exportables más importantes del Grupo Empresarial Agroforestal del Ministerio de la Agricultura. Además de las tradicionales ventas de miel y cera al exterior, existen otros productos con valor comercial como son: las láminas de cera, la jalea real, los suplementos nutricionales, los cosméticos, el propóleo y sus derivados, las bebidas, las velas, los bombones y las producciones para la industria farmacéutica. La miel se destina como insumo para la producción de medios biológicos utilizados contra plagas, elaborados en Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (Salomón, 2018).

## 1.2 Enfermedades que afectan a las abejas melíferas

La abeja *A. mellifera*, como todo un organismo vivo, es susceptible a la acción de diversos agentes etiológicos y depredadores. Estos causan el deterioro de su salud, lo que propicia importantes mermas productivas en la industria apícola. La colmena constituye la unidad básica de estos insectos y se considera enferma cuando determinada cantidad de los individuos que la conforman lo están (Pérez, 2017).

Según aseveraciones de Pérez-Morfi (2020), la salud de las colmenas no se define solamente por la ausencia de enfermedades. Se debe tener en cuenta también la existencia de colonias bien nutridas, capaces de reproducirse y resistir de manera exitosa los desafíos de los agentes etiológicos de diversa naturaleza.

Al respecto, el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), incluye una lista de enfermedades de las abejas consideradas de importancia internacional, debido a su potencial para propagarse a través de fronteras y causar pérdidas económicas significativas. Entre ellas están la varoosis, la Loque americana (LA), la Loque europea, el pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*) y la nosemosis (Pérez, 2017).

La varoosis es una parasitosis externa contagiosa de gran significación para el sector apícola en Cuba y la provoca el ácaro *Varroa destructor* (Sanabria *et al.*, 2016). Este se alimenta exclusivamente de la hemolinfa de las abejas. Se reproduce dentro de la cría de las obreras y los zánganos, con preferencia por estos últimos. *V. destructor* penetra dentro de una celda poco antes de la percolación y pone huevos que se desarrollan en el interior de la celda operculada (Ramsey *et al.*, 2019). Los síntomas observados son: colmenas débiles, abejas mal formadas, desorganización social, consumo anormal de las reservas de miel, pequeño grupo de abejas débiles y crías salteadas. Para su diagnóstico, se recomiendan dos metodologías: el examen del fondo de la colmena o el método del cartón blanco, además del análisis de muestras en laboratorio, tanto de abejas adultas, como de trozos de panal (Marche *et al.*, 2019).

La Loque europea es una enfermedad que ataca a las larvas de las abejas causada por la bacteria Gram positiva *Melissococcus plutonius*. Afecta principalmente a la cría no operculada y provoca su muerte. Los síntomas visuales son la pérdida de la posición normal de la larva en la celda (enrollada en forma de C), ya que aparecen retorcidas o en posiciones inusuales, también cambian de un color blanco perlado brillante a un color amarillento, grisáceo o incluso marrón, la consistencia se vuelve acuosa, pastosa o granulosa. La transmisión y persistencia del agente patógeno en la colmena depende de la supervivencia de individuos afectados, quienes depositan las bacterias junto con las heces en las celdas al pupar. Esta enfermedad puede causar pérdidas significativas en la producción de miel (Calderón *et al.*, 2018; Ivars, 2022).

El pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*) se originó en África subsahariana y en la actualidad, se encuentra en otras partes del mundo. En las colmenas, tanto los escarabajos adultos como sus larvas provocan daños, ya que se alimentan de la miel y el polen. No obstante, las larvas causan el mayor deterioro en la colonia, pues se alimentan de las crías de las abejas. Estas forman galerías en los panales y ocasionan la fermentación de la miel, debido a la levadura *Kodamea ohmeri*, presente en sus deyecciones. El primer signo de infestación en las colonias es la presencia de escarabajos adultos y en infestaciones severas, se observan larvas y miel fermentada. Este parásito oportunista de las colmenas de *A. mellifera* se reportó en Cuba en el año 2012, sin que provocara perjuicios apreciables (Lóriga *et al.*, 2015).

La nosemosis es una enfermedad causada por hongos microsporidios, clasificados antiguamente dentro del género *Nosema* y actualmente incluidos dentro del género *Vairimorpha*. Existen tres especies involucradas principalmente: *Vairimorpha ceranae*, *V. apis* y *V. neumanni* (Imani *et al.*, 2022). Estos microorganismos patógenos son parásitos intracelulares obligados que proliferan en las células del epitelio intestinal de las abejas y perturban sus procesos digestivos. Como resultado, las abejas sufren deficiencias nutricionales, el envejecimiento acelerado

y la disminución de su esperanza de vida. Además, la nosemosis impacta negativamente en las glándulas hipofaríngeas de las abejas obreras encargadas de alimentar a la cría, lo que reduce la producción de jalea real que es esencial para el desarrollo larval. Si la abeja reina se afecta, las obreras a menudo la reemplazan, lo que puede llevar al colapso de la colonia (Jabal-Uriel *et al.*, 2022).

### **1.2.1 Incidencia de la Loque americana en las abejas**

La Loque americana (LA) la provoca el agente etiológico *P. larvae*, una bacteria bacilar, Gram positiva, anaerobia facultativa y formadora de endosporas. Representa uno de los agentes patógenos más temidos para la apicultura mundial, debido a sus singulares características biológicas y su extraordinaria capacidad de persistencia ambiental (Ebeling *et al.*, 2021).

Esta enfermedad es altamente contagiosa y afecta principalmente a las larvas de las abejas, provocándole la muerte y como consecuencia, ocurre la diseminación de esporas que pueden permanecer viables por más de cinco décadas en condiciones ambientales adversas. Estas constituyen el principal vehículo de diseminación de la enfermedad y su resistencia dificulta la erradicación de la bacteria patógena en la colmena, al quedar latentes en las colonias y equipos utilizados. Si la infección no se controla a tiempo, puede llevar al colapso completo de la colmena, lo que genera pérdidas importantes para los apicultores y altera los procesos de polinización en los ecosistemas (Daisley *et al.*, 2020a; Ye *et al.*, 2025).

El ciclo patogénico de la LA se inicia cuando las larvas ingieren o consumen alimento contaminado. Las abejas nodrizas pueden albergar las esporas tanto sobre la superficie corporal como dentro de su tracto digestivo. De este modo, al alimentar a las larvas, las nodrizas portadoras transmiten oralmente la infección o inclusive lo hacen indirectamente al contaminar la celda (figura 1).

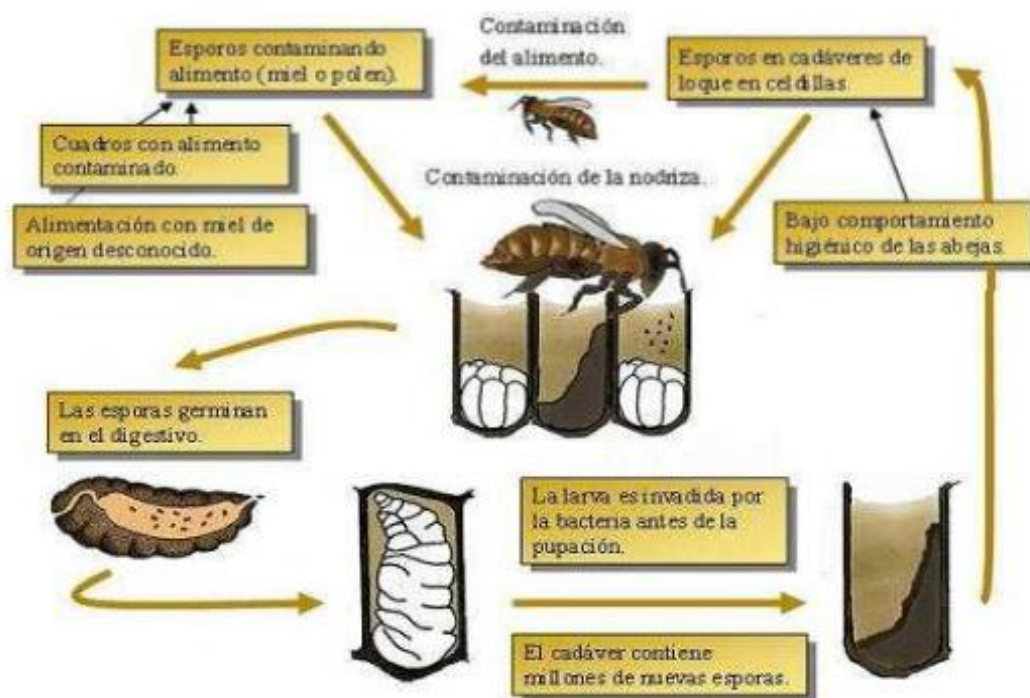


Figura 1. Ciclo patogénico de *Paenibacillus larvae* (Fuente: Pérez Cobo & Fernández Somalo, 2014).

Una vez dentro del intestino de la larva, las esporas germinan después de un período variable que fluctúa entre las 24 y 48 horas, originándose así las formas vegetativas. En el siguiente estadio, durante el desarrollo de la prepupa, los bacilos penetran activamente en la membrana peritrófica y la pared intestinal y ocurre la invasión bacteriana de la hemolinfa. A partir de ese momento, la bacteria sigue desarrollándose y reproduciéndose rápidamente, lo que ocasiona la muerte de la cría por septicemia generalizada. La muerte se produce en el estado de prepupa o pupa y luego de transcurridos varios días, la larva se deseca y adquiere un color negro. Esta etapa se denomina “escama” y tiene un alto poder infectivo. Se puede identificar claramente cuando se observan los marcos de cría de los panales afectados y presentan una distribución irregular. Esta combinación de factores de

virulencia conduce a una septicemia fatal entre los 6-14 días post-infección (Ye *et al.*, 2025).

Los síntomas clínicos de la LA son típicos, se observan restos de larvas viscosas que forman un hilo rojizo cuando se extraen con una cerilla (figura 2). La cría en descomposición se seca en escamas duras, adhiriéndose firmemente a las seis paredes de las celdas que consisten en millones de esporas bacterianas que constituyen la etapa infecciosa del patógeno. También se percibe un olor a putrefacción característico (similar a cola de pescado) (Genersch, 2006). El diagnóstico puede confirmarse con pruebas de laboratorio, como PCR o cultivos bacterianos, aunque los síntomas clínicos suelen ser suficientes para identificarla en campo (Budge *et al.*, 2020).



Figura 2. Panales infectados por la bacteria *Paenibacillus larvae*. Opérculos perforados (Fuente: López y Underwood, 2023).

Para controlar esta infección se emplean varios métodos como la destrucción de la colmena enferma total o parcial por incineración, desinfección de los materiales apícolas por medio de la irradiación con cobalto-60, lavado con sosa cáustica e inmersión en parafina (Del Hoyo, 1998). La excepcional resistencia de las esporas, combinada con la capacidad de *P. larvae* para formar biofilms protectores y su

variabilidad genética, explican los fracasos recurrentes en el control de la enfermedad mediante métodos convencionales. Mientras que el tratamiento con oxitetraciclina puede suprimir temporalmente las formas vegetativas, carece de efecto sobre las esporas y contribuye al desarrollo de resistencias (Genersch, 2010). Esta realidad impulsó la investigación en alternativas innovadoras que incluyen el uso de bacteriófagos específicos, probióticos competitivos y compuestos quelantes que interfieren con la germinación esporal (D'Alvise, 2023).

### **1.3 Probióticos. Características generales**

#### **1.3.1 Concepto de probióticos. Principales microorganismos empleados como probióticos**

La palabra probióticos proviene del griego “pro” y “bios” que significa “a favor de la vida”. Lilly y Stillwell (1965) fueron los primeros en utilizar este término para designar a las sustancias que producen los microorganismos y que promueven el crecimiento de otros. Sin embargo, este concepto se modificó y numerosos investigadores lo designan desde hace varios años como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, le confieren un beneficio a la salud del huésped (FAO/OMS, 2001; Pacheco *et al.*, 2023).

Los probióticos son responsables de mediar una amplia variedad de problemas de salud, ya que intervienen en la homeostasis intestinal, constituyen la primera barrera del sistema inmune al activar macrófagos y elevar la concentración de inmunoglobulinas, disminuyen la infección por bacterias patógenas en la mucosa intestinal, ya que compiten por los sitios de adherencia de las células, mejoran la biodisponibilidad de nutrientes y la productividad de los animales (Yousefi *et al.*, 2019; Pacheco *et al.*, 2023).

Dentro de los principales microorganismos empleados como probióticos están el grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), representado por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Estos son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Lactococcus*,

*Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Propionibacterium*. Ellos se utilizan en la formulación de biopreparados tanto para humanos, como para animales (Alayande *et al.*, 2020).

La atención se centra en estas bacterias debido a que se utilizan en la industria alimentaria desde hace siglos para elaborar productos fermentados de forma segura, así como también para mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos. En general, las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporuladas, usualmente no móviles, anaerobias facultativas, oxidasa y catalasa negativas.

Se pueden clasificar a las BAL en base a los productos generados durante la fermentación de los carbohidratos (Goh *et al.*, 2021). El grupo llamado homofermentativo, produce ácido láctico como producto principal en la fermentación. 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 sino también acetato, etanol y CO<sub>2</sub>. Dentro de este grupo están los géneros *Leuconostoc* y algunas especies de *Lactobacillus* (Stephen & Saleh, 2023).

En particular, el género *Lactobacillus* se considera un atractivo aspirante para utilizarse con este fin. Producen sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas, que pueden inhibir el crecimiento y la colonización de bacterias patógenas en el tracto digestivo (Alayande *et al.*, 2020). Los géneros *Bifidobacterium* y *Bacillus* no se incluyen dentro de las BAL, pero también se emplean comúnmente como probióticos (Milián *et al.*, 2023).

### **1.3.2 Criterios de selección para cepas con potencial probiótico en abejas**

Los principales criterios de selección utilizados para cepas candidatas a probióticas en abejas son: deben ser resistentes a las altas concentraciones de azúcares, tener una alta capacidad de crecimiento, producir sustancias antimicrobianas frente a los patógenos de las abejas, crecer a diferentes pH, estimular el sistema inmunológico, 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 (Antúnez, 2012).

### **1.3.3 Modo de acción de los probióticos en las abejas**

Los mecanismos de acción precisos de los probióticos en abejas aún se encuentran en investigación, pero se detectan algunas acciones potenciales como son: la modulación de la microbiota intestinal, la competencia con patógenos, la mejora de la nutrición, el fortalecimiento de la barrera intestinal, el refuerzo del sistema inmunitario y la producción de sustancias antimicrobianas (Royan, 2019).

- **Modulación de la microbiota intestinal**

El intestino de las abejas melíferas alberga una comunidad microbiana diversa y compleja, compuesta principalmente por bacterias de los géneros *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Frischella* (Engels & Moran, 2013; Tilocca *et al.*, 2024). Esta microbiota desempeña un papel fundamental en la salud de las abejas y ayudan a la digestión de polisacáridos complejos, la síntesis de vitaminas y la protección contra patógenos (Hariprasath *et al.*, 2025a). La aplicación de los probióticos puede modular la composición y la función de la microbiota intestinal, al promover el equilibrio microbiano favorable para la salud de las abejas (Raymann & Moran, 2018).

- **Competencia con patógenos**

Los probióticos compiten directamente con los microorganismos patógenos por los nutrientes y los sitios de adhesión en el intestino de las abejas. Al establecerse en este nicho, limitan el espacio y los recursos disponibles para los patógenos, lo cual inhibe su proliferación (Vázquez *et al.*, 2021).

- **Mejora de la nutrición**

Los probióticos pueden producir enzimas digestivas como proteasas, amilasas y lipasas que facilitan la descomposición de proteínas, carbohidratos complejos y grasas que se presentan en el polen y el néctar, lo que garantiza la disponibilidad

de nutrientes esenciales para las abejas. Algunos de estos microorganismos pueden sintetizar vitaminas y compuestos bioactivos que benefician la salud de estos insectos (Kim *et al.*, 2024).

- **Fortalecimiento de la barrera intestinal**

Contribuyen a mantener la integridad de la barrera intestinal, al prevenir la translocación de patógenos y toxinas al hemocele de la abeja. Al fortalecer las uniones estrechas entre las células epiteliales del intestino, los probióticos reducen la permeabilidad intestinal y protegen a la abeja contra infecciones sistémicas (Todorov *et al.*, 2024).

- **Estimulación del sistema inmunitario**

Las abejas melíferas poseen un sistema inmunitario innato complejo que les permite defenderse contra una amplia gama de microorganismos perjudiciales (figura 3). Se basa en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo que desencadena una cascada de señalización que conduce a mecanismos de defensa como la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs), la fagocitosis y la encapsulación (Evans & Wheeler, 2018).

Los probióticos, al igual que otros microorganismos, poseen PAMPs en su superficie celular, los cuales se unen a los PRRs presentes en las células inmunitarias de las abejas y conducen a la producción de citoquinas (moléculas de señalización intercelular) y factores de transcripción (proteínas que regulan la expresión de genes). Estas moléculas controlan la actividad de las células inmunitarias y la producción de moléculas de defensa. Entre ellas tenemos la síntesis de AMPs como la abecina, la himenoptaecina, la defensina y la apidaecina, que tienen una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus. También se estimula la fagocitosis y la encapsulación de parásitos, lo que impide su crecimiento y diseminación (Motta *et al.*, 2022).

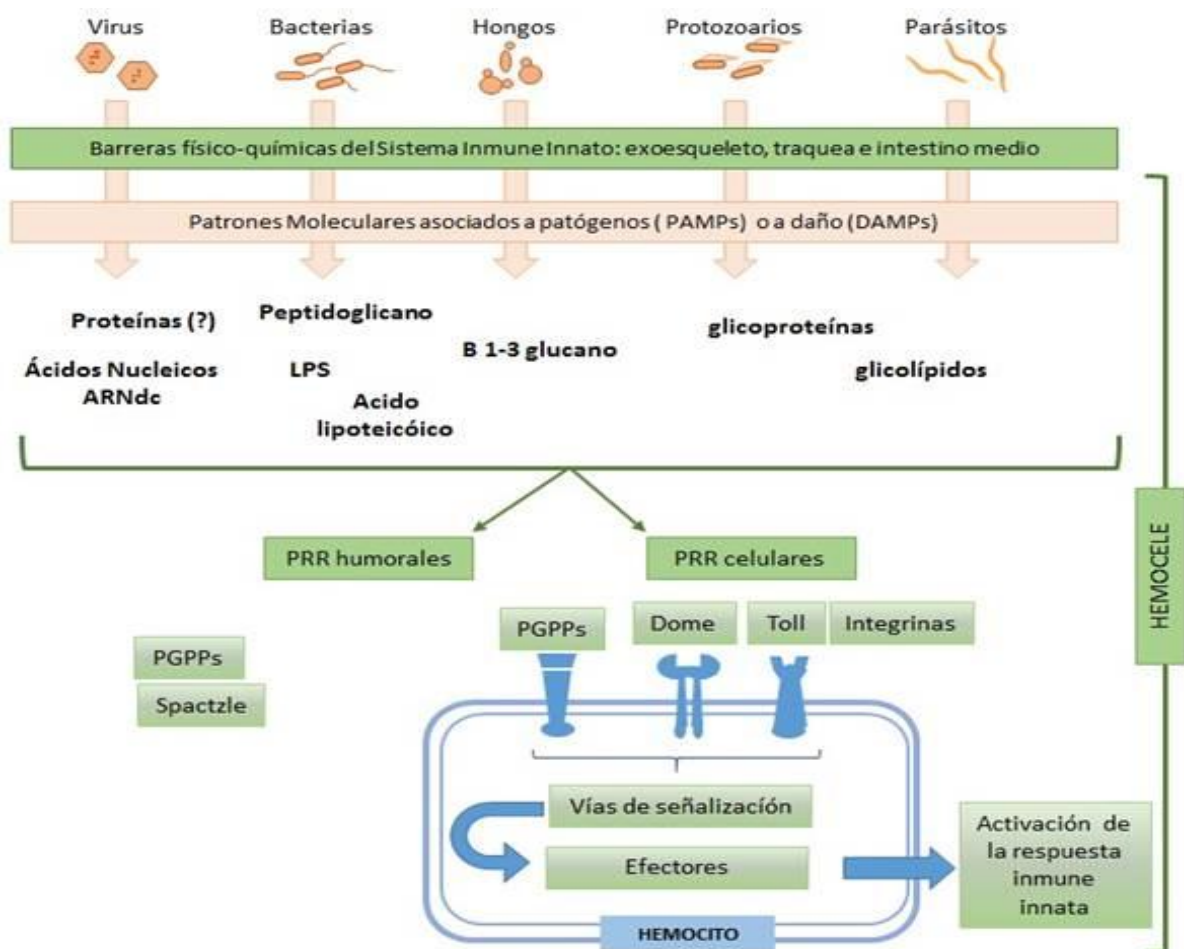


Figura 3. Regulación de la respuesta inmune en las abejas (Fuente: Larsen *et al.*, 2019).

- **Producción de sustancias antimicrobianas**

Las cepas probióticas secretan sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas (Vieco-Saiz *et al.*, 2019). Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos, que se secretan extracelularmente y no son tóxicas para las células eucariotas. Además, ellas presentan alta actividad bactericida o bacteriostática en cepas o especies relacionadas, en microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Al-Yami *et al.*, 2022).

De acuerdo con su composición, tamaño, modo de acción y espectro de inhibición, las bacteriocinas de las BAL se clasifican en tres clases generales: lantibióticos, no lantibióticos y péptidos de gran tamaño. Por lo general, ellas destruyen la integridad de la membrana citoplasmática o la pared celular a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones, necesaria para la producción de energía, síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (figura 4) (Hernández-González *et al.*, 2021).

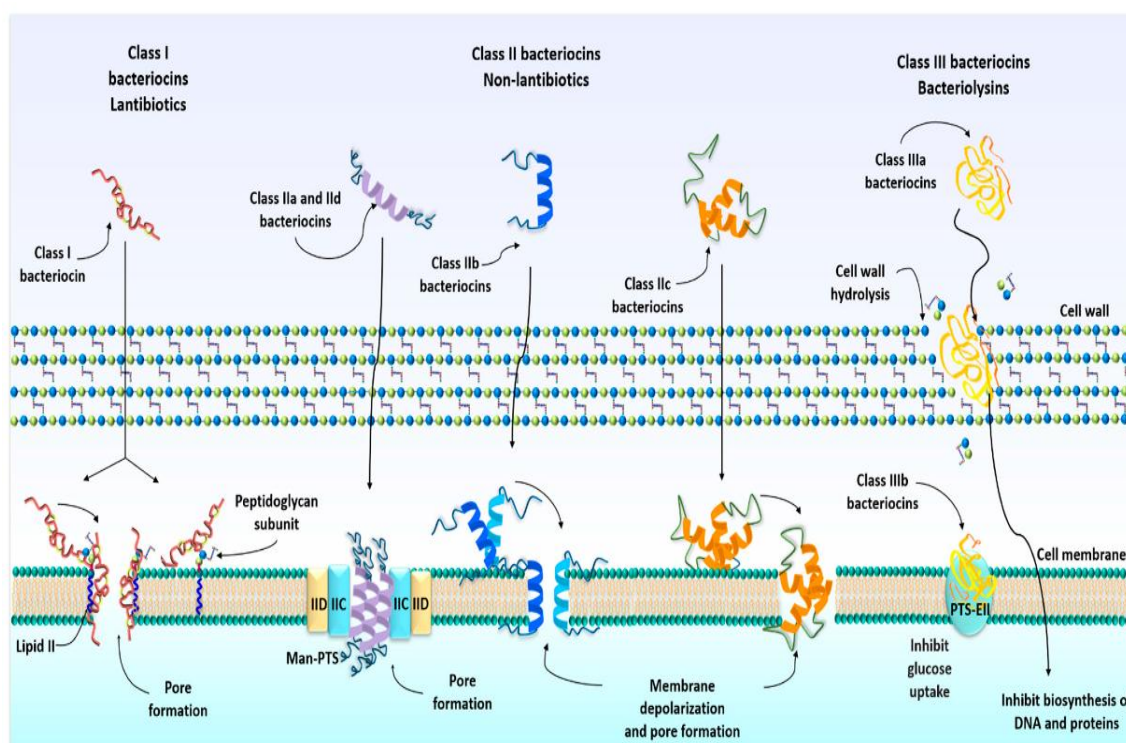


Figura 4. Modo de acción de las bacteriocinas (Fuente: Hernández-González *et al.*, 2021).

Los ácidos orgánicos reducen el pH intracelular e inhiben el transporte activo del exceso de protones internos que requiere el consumo de trifosfato de adenosina (ATP), lo que conduce al agotamiento de la energía celular. Los principales objetivos de los ácidos orgánicos son la pared celular bacteriana, la membrana citoplasmática y las funciones metabólicas específicas (replicación y síntesis de proteínas) de microorganismos patógenos, lo que conduce a su alteración y muerte. El ácido

láctico producido por las BAL en el tracto digestivo de las abejas induce a un microambiente local desfavorable para las bacterias patógenas, que en su mayoría tienen un rango de pH óptimo que suele ser neutro o ligeramente alcalino (Iatsenko *et al.*, 2021).

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que puede dañar las células microbianas al oxidar los lípidos, proteínas y el ADN. Este daño oxidativo puede inhibir el crecimiento y la proliferación de las bacterias patógenas y hongos en el intestino de la abeja. Además, puede actuar como factor selectivo de la microbiota intestinal, al favorecer el crecimiento de las bacterias tolerantes y suprimir el crecimiento de las bacterias sensibles a este compuesto (Evans & Wheeler, 2018; Iatsenko *et al.*, 2021).

#### **1.4 Características del género *Lactobacillus***

Según la taxonomía del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), la jerarquía taxonómica del género *Lactobacillus* fue objeto de revisión y reestructuración, debido a los avances en genómica y microbiología. Actualmente se clasifican: Dominio: Bacteria; Filo: Firmicutes; Clase: Bacilli; Orden: Lactobacillales; Familia: Lactobacillaceae y Género: *Lactobacillus* (Al-Yami *et al.*, 2022).

Este género comprende más de 200 especies que se distinguen por su diversidad filogenética y metabólica. Se caracterizan por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos que comúnmente forman cadenas. Son Gram positivos, no forman endosporas y no son móviles de manera general. Su metabolismo es fermentativo y se clasifican en dos grupos principales: homofermentativas (producen ácido láctico a partir de la glucosa a través de la vía de la glucólisis o Embden-Meyerhof-Parnas) y heterofermentativas (producen ácido láctico, etanol o ácido acético y CO<sub>2</sub> a partir de la glucosa a través de la vía de la fosfoacetolasa). Pueden fermentar una amplia

variedad de carbohidratos como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, entre otros.

Son nutricionalmente exigentes, lo que significa que requieren una gran variedad de nutrientes para su crecimiento como aminoácidos, vitaminas y nucleótidos que varían de acuerdo a la especie. Son catalasa y oxidasa negativos, viven en un rango de temperatura entre 2-53°C, con una temperatura óptima entre 30-40°C, crecen bien en medios ligeramente ácidos con pH óptimo de desarrollo entre 5,5-6,2 y generalmente son aerotolerantes, pues su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas (Shah *et al.*, 2024).

Entre los probióticos más populares y ampliamente utilizados durante muchos años hasta la fecha están los representantes del género *Lactobacillus*, que ejemplifica el grupo heterogéneo más grande entre las bacterias ácido lácticas (BAL). Normalmente ocupan diversos entornos con altos niveles de nutrientes, como el suelo, los seres humanos, el agua, las plantas, los animales e incluso el aire, sin provocar de manera general ninguna enfermedad (Dengiz *et al.*, 2025).

### **1.5 Efectos de la aplicación de probióticos en abejas**

La creciente preocupación por la salud de las abejas melíferas (*A. mellifera*) impulsó el desarrollo de investigaciones en estrategias para fortalecer su sistema inmunológico y mejorar su resistencia a las enfermedades. Entre ellas se destaca la obtención de probióticos, aditivos nutricionales que le confieren múltiples beneficios a la salud del huésped (Iorizzo *et al.*, 2022).

Varios estudios demuestran que la administración de probióticos puede aumentar la resistencia de las abejas a la LA. Según Alberoni *et al.* (2022), la suplementación de cepas probióticas de *Bacillus* spp. a colonias de *A. mellifera* redujo significativamente la prevalencia de este padecimiento y mejoró la supervivencia de las abejas en colmenas infectadas. El mecanismo propuesto implica la producción

de bacteriocinas por parte de la bacteria aplicada, que inhibe el crecimiento del patógeno y estimula el sistema inmunológico de las abejas.

Un estudio realizado por Yoshiyama *et al.* (2013), con nueve BAL frente a *P. larvae* *in vitro*, detectó una fuerte inhibición de este microorganismo patógeno debido a la reducción del pH, lo que evidencia la producción de diferentes metabolitos antimicrobianos como son el ácido láctico y el ácido acético. Otros autores refieren que cepas de *Lactobacillus kunkeei*, aisladas de la microbiota de abejas melíferas, inhibieron el crecimiento de *P. larvae* y *N. ceranae*, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. La administración de estos aislados incrementó la viabilidad de las larvas y redujo la mortalidad asociada a la infección de *P. larvae* (Arredondo *et al.*, 2018).

Besharati *et al.* (2024) evaluaron el efecto de un probiótico comercial denominado Lactofid compuesto por cuatro cepas bacterianas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium*) en los rasgos funcionales de las colonias, los parámetros cuantitativos y cualitativos de la miel y la flora microbiana intestinal en abejas melíferas. Los tratamientos experimentales que se incluyeron fueron: 2 g de antibiótico (control), 1 g de probiótico, 2 g de probiótico, 3 g de probiótico y 1 g de antibiótico + 1 g de probiótico, todos por litro de jarabe para cada colmena. Los resultados mostraron que las abejas alimentadas con los tratamientos de 2 o 3 g de probiótico por litro de jarabe tuvieron mayor población y producción de miel en las colmenas que los otros grupos experimentales ( $p < 0,05$ ). Además, aumentaron los recuentos de *Lactobacillus* en los intestinos de las abejas en comparación con los otros tratamientos ( $p < 0,05$ ). Por su parte, la suplementación de 1 o 2 g de probiótico y 2 g de antibiótico por litro de jarabe para cada colmena disminuyó los recuentos de *Escherichia coli* en el intestino.

La aplicación de estos aditivos microbianos modifica la microbiota intestinal de las abejas. En este sentido Sinekçi *et al.* (2024), evaluaron los efectos de un probiótico comercial que contenía diferentes especies de *Lactobacillus* y extractos de especias sobre la composición de la microbiota intestinal de las abejas melíferas. Se

realizaron recuentos mediante QPCR de copias de genes de *Lactobacillus* spp. y del filo Firmicutes en mezclas intestinales de 12 grupos de abejas con y sin suplementación probiótica. Al comparar los niveles de *Lactobacillus* spp. en el intestino de las abejas melíferas que no recibieron probióticos, con las que sí los recibieron, se evidenció una diferencia aproximada de 5,5 veces mayor. Sin embargo, no se observaron diferencias en la carga de Firmicutes en el intestino de las abejas de ambos grupos. Estos hallazgos demostraron que la formulación probiótica aplicada afectó significativamente el microbioma intestinal de individuos sanos y proporcionó cambios proporcionales en la abundancia microbiana, especialmente en términos de *Lactobacillus* spp.

Elenany & Hassan (2023), investigaron el impacto de las bacterias ácido lácticas específicas (Hbs-LAB) aisladas del tracto intestinal de las abejas obreras en la salud de estos insectos, así como en los parámetros de actividad de las colonias. Se definieron 2 grupos experimentales, cada uno de 10 colonias. Las colonias control se alimentaron con jarabe de azúcar, mientras que las tratadas se alimentaron con jarabe de azúcar suplementado con una mezcla de Hbs-LAB (*Lactobacillus brevis*-HBE2, *Lactobacillus casei*-HBE5 y *Enterococcus faecalis*-HBE1, 3 g de estas bacterias (1:1:1) mezcladas en 1,5 L de jarabe de azúcar). Las colmenas tratadas registraron diferencias con valores superiores en todos los parámetros de actividad (áreas de cría de obreras y zánganos, número de panales cubiertos de abejas, cantidad de miel y polen almacenado) en comparación con las colonias controladas.

Los probióticos también pueden reducir los efectos de las enfermedades virales en las abejas. Salamanca-Loyola (2024), estudió el efecto de un consorcio probiótico compuesto por seis bacterias reproducidas en condiciones controladas y suministradas a *A. mellifera* por ingesta *ad libitum*, para evaluar la actividad antiviral frente al virus de alas deformadas (DWV-A), su efecto en el sistema inmune y la sobrevivencia. Se aplicaron concentraciones de 60.000, 6.000 y 600 UFC por abeja, donde la concentración más elevada, logró reducir significativamente la carga viral en abejas inoculadas con el virus. Se observó un aumento de la respuesta inmune,

relacionada con la sobreexpresión de los genes codificantes para los péptidos antimicrobianos abaecina y defensina, lo cual fue concordante con el aumento de la sobrevivencia de *A. mellifera*.

Los probióticos también se consideran una herramienta profiláctica prometedora para reducir los niveles de elementos tóxicos o potencialmente tóxicos en las abejas. En este sentido, Astolfi *et al.* (2022) recolectaron abejas, cera, miel, polen y propóleo directamente de colmenas en una zona rural del centro de Italia para investigar el contenido de 41 elementos en los grupos control (sin probióticos) y experimental (con probióticos). Como resultado se observó una concentración significativamente menor de algunos elementos (Ba, Be, Cd, Ce, Co, Cu, Pb, Sn, Tl y U) en las abejas experimentales que en los grupos control, lo que indica un posible efecto beneficioso de los probióticos en la reducción de la absorción de estas sustancias químicas. Por su parte, Leska *et al.* (2023) confirmaron que los metabolitos que producen las BAL disminuyen la citotoxicidad de los insecticidas (hasta un 19,32%), lo cual demuestra su actividad citoprotectora.

Fang *et al.* (2023), estudiaron los efectos de la combinación de *Lactobacillus helveticus* e isomaltooligosacáridos (IMO) sobre la supervivencia, la microbiota intestinal y la función inmune en las abejas obreras de *Apis cerana*. La administración de *L. helveticus* KM7 e IMO aumentó significativamente la tasa de supervivencia en las abejas obreras en relación con las abejas alimentadas solo con sacarosa. También se observó una mayor concentración de BAL y *Bifidobacterium* en el intestino y menores recuentos de hongos intestinales, *Enterococcus* y *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella* en las abejas. Además, el tratamiento combinado mejoró la expresión de genes ARNm de péptidos antimicrobianos, como la abaecina, la defensina y el gen que codifica la profenoloxidasasa (PPO) en el intestino, en comparación con las abejas control.

Autores como Borges *et al.* (2021), evaluaron los efectos de prebióticos y probióticos en las abejas melíferas (*A. mellifera*) infectadas con el parásito microsporidio

*Nosema ceranae*. Entre los prebióticos utilizaron fibra dietética goma de acacia, inulina y fructooligosacáridos, así como los probióticos comerciales Vetafarm Probotic, Protexin Concentrate de cepa única (*Enterococcus faecium*) y Protexin Concentrate de múltiples cepas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus salivarius* y *E. faecium*). Se comprobó que la goma arábiga causó la mayor reducción del número de esporas de *N. ceranae* (67%), pero también aumentó significativamente la mortalidad de las abejas (62,2%). Sin embargo, el Protexin Concentrate de una sola cepa produjo una reducción similar en el número de esporas (59%), sin afectar la mortalidad.

Carvajal *et al.* (2023), aislaron y caracterizaron un probiótico inmunomodulador capaz de mejorar la salud de las colonias de abejas. Los resultados demostraron que la cepa *Lactobacillus casei* A14.2 aumentó la expresión de ARNm que codifica los péptidos antimicrobianos a las 24 h después de la administración. También provocó la disminución gradual y sostenida de la infestación ( $p < 0,05$ ) por el microsporidio *Nosema* spp.; sin embargo, no se observó la reducción de la infestación por el ácaro *Varroa destructor*. Estos resultados sugieren que la administración de este potencial probiótico, pudiera aumentar la resistencia de las colonias de abejas a enfermedades infecciosas causadas por *Nosema* spp.

Uno de los microorganismos patógenos que inciden en el intestino de las abejas es el hongo *Ascophaera apis*, cuyas esporas ingresan al interior de las larvas, las colonizan y momifican. Una alternativa a esta situación es el suministro de bacterias probióticas, que refuerzan la microbiota intestinal y contribuyen a la defensa contra este hongo. En este sentido, Cavana *et al.* (2021) aislaron, seleccionaron e identificaron genéticamente cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico a partir del polen conservado. De las 10 cepas seleccionadas, tres lograron inhibir a este hongo: *Lactobacillus kunkeei* LSAJ (MF435935), *Lactobacillus melliventris* LSAM (MF435936) y *Lactobacillus helsingborgensis* LSAI (MF435934), lo que las hace promisorias para una futura aplicación en colmenas.

## *Capítulo 2*

## **CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas. El trabajo se desarrolló en cuatro bloques experimentales, los que se muestran en la figura 5. En los diferentes capítulos, se detallan los materiales y procedimientos específicos para cada uno de los experimentos. A continuación, se describen los materiales y métodos que, de forma general, se utilizaron en toda la secuencia experimental.

### **2.1 Material biológico y medios de cultivo**

#### **2.1.1 Cepas de *Lactobacillus* spp.**

Las cepas de *Lactobacillus* que se utilizaron se aislaron a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*. Se obtuvo una colección de 13 cepas de *Lactobacillus* spp. que se encuentran en el banco de cepas del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas.

#### **2.1.2 Cepa de *Paenibacillus larvae***

La bacteria patógena *P. larvae* que se utilizó en la investigación procede del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spíritus, Cuba (LARISA) y se conserva en el banco de cepas del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas.

#### **2.1.3 Medios de cultivo**

##### **Medios agar J y caldo J (Hornitzky & Karlovskis, 1989)**

Este medio se utilizó en los ensayos donde se empleó *P. larvae*. La composición química por litro de este medio es: 5 g de triptona, 15 g de extracto de levadura, 3 g de  $K_2PO_4$  y 2 g de glucosa. El medio sólido se preparó con la adición de  $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de agar bacteriológico (BioCen).

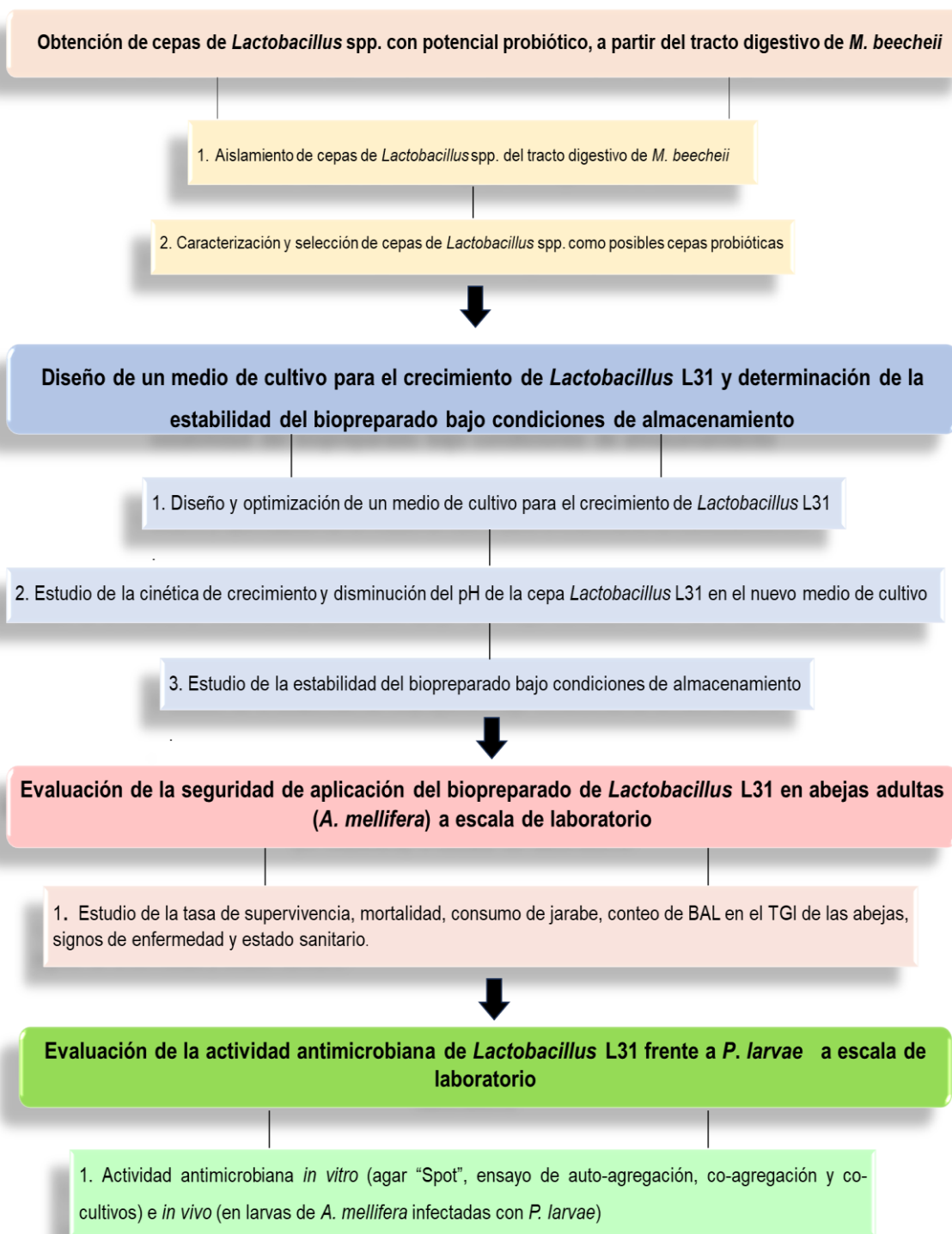


Figura 5. Diagrama de la secuencia experimental desarrollada en el presente trabajo.

## Medios agar MRS y caldo MRS

El medio MRS (De Mann *et al.* 1960) (BioCen, Cuba) se utilizó en todos los experimentos donde se trabajó con cepas de *Lactobacillus*. La composición del medio por litro es la siguiente: 20 g de dextrosa, 10 g de peptona, 8 g de extracto de carne, 4 g de extracto de levadura, 2 g de citrato de amonio, 5 g de acetato de sodio, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,05 g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$  y 1 g de Tween 80. El medio sólido se elaboró con la adición de  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de agar bacteriológico (BioCen).

### 2.2 Conservación de cepas

Las cepas de *Lactobacillus* spp. se conservaron en tubos de cultivo con tapa de rosca, que contenían medio Tioglicolato (BioCen, Cuba) semisólido ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de agar) con carbonato de calcio (0,1 g por tubo). La cepa de *P. larvae* se conservó en cuñas de agar J.

### 2.3 Técnicas de cultivo y conteos de *Lactobacillus* spp.

#### 2.3.1 Condiciones de cultivo

Para el crecimiento de *Lactobacillus* spp. en medios líquidos, los cultivos se mantuvieron en condiciones estáticas (anaerobiosis) y en medios sólidos los lactobacilos se sembraron a profundidad y en condiciones microaerófilas (adición doble capa de agar). En ambos casos la temperatura de incubación fue de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 o 48 horas, respectivamente.

#### 2.3.2 Conteos de *Lactobacillus*

Para efectuar el conteo de *Lactobacillus* spp. se realizaron diluciones seriadas de las muestras en una relación de inoculación de 1:10 (v/v) en agua de peptona (OXOID), desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ , generalmente. Las tres últimas diluciones se inocularon individualmente (1 mL) a profundidad en placas con agar MRS. Esta

operación se replicó tres veces y las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis por 48 h. Posteriormente, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias.

## **2.4 Análisis químicos**

### **2.4.1. Determinación de pH**

La medición de los valores de pH se realizó en un pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

## **2.5 Condiciones para el traslado de las abejas**

Las abejas vivas recolectadas en cada uno de los experimentos, se trasladaron en horas tempranas de la mañana bajo condiciones de máxima seguridad. Se taparon con mantas para minimizar el estrés de estos insectos.

## **2.6 Procesamiento estadístico**

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico *Statgraphics Centurion* 19.1.1 sobre Windows (Statgraphics, 2020). Se realizaron análisis de varianza con modelos de clasificación simple para determinar la presencia de diferencias entre las muestras. Se determinó el ajuste de los datos a una distribución normal mediante la prueba de Shapiro & Wilk (1965) y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene (1960). Para el contraste de las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD con un nivel de significación de  $p < 0,01$ . Los datos se muestran como la media  $\pm$  de la desviación estándar.

## *Capítulo 3*

## **CAPÍTULO 3. OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus* spp. CON POTENCIAL PROBIÓTICO, A PARTIR DEL TRACTO DIGESTIVO DE *M. beecheii*.**

### **Introducción**

Dentro del vasto mundo microbiano, las bacterias del género *Lactobacillus* emergen como candidatos probióticos, ideales para su aplicación en la apicultura. Tradicionalmente asociadas con alimentos fermentados y la salud humana, ellas también forman parte natural y a menudo dominante de la microbiota intestinal de las abejas. Su presencia se vincula a procesos digestivos, modulación del sistema inmunitario y competencia con patógenos (Urcan *et al.*, 2024b; Hariprasath *et al.*, 2025b). Por lo tanto, el aislamiento y selección de bacterias autóctonas del género *Lactobacillus* directamente del tracto digestivo de estos insectos, permite asegurar la obtención de microorganismos adaptados a ese entorno específico, lo que aumenta la probabilidad de que puedan colonizar eficazmente, persistir y ejercer efectos beneficiosos en este ecosistema (Shah *et al.*, 2024; Shehata *et al.*, 2024).

A partir de lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente capítulo se dirigió a:

- ✓ Obtener cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico, a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*.

### **Materiales y métodos específicos**

#### **3.1 Aislamiento de *Lactobacillus* spp. del tracto digestivo de *M. beecheii***

Se colectaron entre 10-20 abejas adultas vivas provenientes de colmenas sanas pertenecientes a cinco apiarios de la Empresa Apícola de Matanzas, Cuba. Para el aislamiento de las bacterias se siguió el protocolo descrito por Engels *et al.* (2013). Las abejas de cada uno de los lotes se desinfectaron previamente (solución clorada al 1%) y se lavaron tres veces con solución salina peptonada estéril para eliminar contaminantes externos. Luego se extrajeron asépticamente los intestinos de las abejas y se homogenizaron en 1 mL de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Se realizaron 8 diluciones seriadas y las tres últimas se sembraron

por triplicado en placas con agar MRS para el crecimiento de *Lactobacillus* spp. Luego se incubaron como se describe en el epígrafe 2.3.1. Posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias con morfología diferente y se sembraron en placas con agar MRS por el método de estrías o agotamiento y se incubaron a 37 °C. Una vez obtenidos los cultivos puros de cada aislamiento, se conservaron en agar tioglicolato suplementado con carbonato de calcio (0,1 g por tubo) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

Los aislamientos se clasificaron de acuerdo a características culturales, la morfología celular, la tinción de Gram y la realización de pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) (Harrigan & McCance, 1966). Se seleccionaron para el estudio las que cumplieron con las características presuntivas del género *Lactobacillus* (Mathialagan *et al.*, 2018).

### **3.2 Caracterización y selección de cepas de *Lactobacillus* spp. como posibles candidatas probióticas**

#### **3.2.1 Determinación de la capacidad de crecimiento y producción de ácidos**

El ensayo se realizó a partir de cultivos frescos de los diferentes aislamientos a 37°C durante 24 h en caldo MRS. Se prepararon diluciones en suero fisiológico (0,85% NaCl) hasta obtener una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala McFarland ( $DO_{600} = 0,132$ ;  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) y se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en frascos con 50 mL de caldo MRS. Luego se incubaron a 37°C durante 24 h en condiciones estáticas. Se tomaron muestras a las 0 y 24 h para realizar posteriormente el conteo de viables a través del método de diluciones seriadas en agua de peptona (1%) desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$  y la siembra en placas. Las placas con agar MRS se incubaron a 37°C por 48 h en condiciones de microaerofilia (Harrigan y McCance, 1966). Se tomó como criterio de selección aquellas cepas que lograron un crecimiento  $\geq 9$  Log UFC. mL<sup>-1</sup>.

La producción de ácidos orgánicos se determinó por una titulación ácido-base del sobrenadante de cada cultivo a las 24 h según el método AOAC 947.05. Se emplearon como reactivos el NaOH 1M y la fenolftaleína como indicador. La concentración de ácidos orgánicos equivalente estuvo dada por el consumo de NaOH 1M en mL, lo que equivale a 90,08 mg de ácido láctico. Se utilizó como control la cepa de *Lactobacillus salivarius* C65 y los resultados se expresaron en g.L<sup>-1</sup> (AOAC, 2023). Cada ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento. Se seleccionaron las mejores cepas productoras de ácidos orgánicos.

### **3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae***

En este ensayo se empleó el método de difusión de sustancias en agar propuesto por Schillinger & Lucke (1989). Como cepa indicadora se utilizó *P. larvae* (cultivada en caldo J), la cual se enfrentó a los metabolitos producidos por cada uno de los aislados en estudio en caldo MRS. Para ello cada cepa de *Lactobacillus* se cultivó en caldo MRS a 37°C por 24 h y posteriormente, se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 min a 5°C (centrífuga T23Janetzki). Luego se tomó el sobrenadante y se añadió en los pocillos dispuestos en placas con agar J sembradas previamente con *P. larvae*. Las placas se colocaron a 4°C durante 4 h para que difundieran las sustancias en el medio y seguidamente se incubaron por 24 h. Se tomó como criterio de selección aquellos aislados que alcanzaron los mayores halos de inhibición. Los resultados de estos tres ensayos se utilizaron como criterios preliminares para seleccionar las mejores cepas que continuarían a estudios posteriores.

### **3.2.3 Determinación de la hidrofobicidad**

Se determinó la hidrofobicidad superficial de las cepas de *Lactobacillus* ssp. mediante la medición de la afinidad por el disolvente orgánico que presentan las células cultivadas en un sistema de dos fases (agua-disolvente orgánico), como medida predictiva de su capacidad de adhesión a epitelios. Este ensayo se realizó según las indicaciones reportadas por Montegudo-Mera *et al.* (2019). Se utilizaron

como solventes orgánicos el xileno y el tolueno. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó a través de la siguiente ecuación:  $H\% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$ , donde  $A_0$  y  $A$  son la absorbancia antes y después de la exposición a los solventes orgánicos respectivamente. La actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como baja (0-29%), media (30- 50%) y alta (51-100%). Se tomó como criterio de selección aquellas cepas candidatas a probióticos que alcanzaron una clasificación alta.

#### **3.2.4 Determinación de la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos**

Para este ensayo se utilizó el método de difusión en discos (Hudzicki, 2009) frente a 13 antibióticos. Se empleó el agar MRS como medio de cultivo 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), bacitricina (BACIT) (40U), ceftiofur (CFT) (30 µg), cloranfenicol (CLOR) (60 µg), doxiciclina (DXT) (30µg), eritromicina (E) (15 µg), cefepine (FEP) (30 µg), kanamicina (K) (30 µg), oxacillin (OX) (1 µg), penicilina G (P) (10 IU), piperacillin (PRL) (100µg), y tetraciclina (TE) (30µg). A las 48 horas de incubación, se midieron los halos de inhibición obtenidos con un pie de rey. Cada análisis se realizó por triplicado. Se tomó como criterio de selección las cepas que mostraron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos probados.

#### **3.2.5 Determinación de la resistencia osmótica al jarabe**

Se prepararon suspensiones de los aislamientos obtenidos en PBS, a partir de cultivos en caldo MRS, incubados 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 prepararon dos jarabes en concentraciones de 1000 y 2000 g de azúcar por litro de agua (1:1 y 2:1 respectivamente), los cuales se utilizan habitualmente por los apicultores en el campo. A partir de las suspensiones originales 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 el método de recuento en placa (MRP) en agar MRS a las 0 y 72 h. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones microaerófilas (Arredondo *et al.*, 2018). Se tomó como criterio de selección definitivo para este estudio aquellas candidatas a probióticos que mantuvieron la viabilidad después de las 72 h.

### 3.2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó según el epígrafe 2.6. Los conteos de las UFC.mL<sup>-1</sup> en los ensayos de capacidad de crecimiento y determinación de la resistencia osmótica al jarabe no cumplieron con los supuestos teóricos del ANOVA, por lo que se empleó la transformación a Log y mejoró el cumplimiento de dichos supuestos. El análisis de varianza se realizó para determinar la presencia de diferencias entre las cepas con respecto a los criterios de selección evaluados.

### Resultados y discusión

De un total de 65 aislados obtenidos a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*, 13 de ellos cumplieron con las características distintivas del género *Lactobacillus* (Mathialagan *et al.*, 2018): colonias con bordes elevados de coloración blanquecina a cremosa de superficie gruesa y brillante. Al microscopio se observaron bacilos Gram positivos que reaccionaron negativamente a las pruebas de catalasa y oxidasa.

Estos resultados concuerdan con estudios recientes realizados por Cerqueira *et al.* (2024), quienes afirman la presencia del género *Lactobacillus* en el tracto digestivo de tres especies de *Melipona* presentes en Brasil. Otras investigaciones también demuestran que este género es predominante en la microbiota intestinal de estos insectos (Mathialagan *et al.*, 2018; Fernández-Robledo *et al.*, 2020; Mohammad *et al.*, 2020).

En la tabla 1, se aprecian los resultados de la capacidad de crecimiento y producción de ácidos orgánicos de las cepas en estudio a las 24 h en caldo MRS. En el primer ensayo, nueve cepas se destacan por presentar valores de concentración celular superiores a 9 Log UFC. mL<sup>-1</sup>, de las cuales cinco (L6, L34, L42, L31 y L32) obtuvieron los mejores resultados sin diferencias entre ellas (p<0,01).

Tabla 1. Criterios de selección preliminares para la determinación del potencial probiótico *in vitro* de las cepas de *Lactobacillus* spp.

Cepas	Capacidad de crecimiento (Log UFC. mL <sup>-1</sup> )	Producción de ácidos orgánicos (g.L <sup>-1</sup> )	Diámetros de inhibición frente a <i>P. larvae</i> (mm)
L6	10,26 ± 0,24 <sup>a*</sup>	13,55 ± 0,03 <sup>g</sup>	42,67 ± 2,52 <sup>a*</sup>
L30	8,97 ± 0,07 <sup>e</sup>	16,75 ± 0,04 <sup>c</sup>	31,67 ± 2,89 <sup>bcd</sup>
L24	9,74 ± 0,12 <sup>bc*</sup>	15,40 ± 0,05 <sup>d</sup>	40,67 ± 2,52 <sup>ab*</sup>
L31	10,01 ± 0,02 <sup>abc*</sup>	12,07 ± 0,03 <sup>i</sup>	43,33 ± 2,89 <sup>a*</sup>
L34	10,26 ± 0,24 <sup>a*</sup>	11,76 ± 0,04 <sup>j</sup>	35,0 ± 5,00 <sup>abcd*</sup>
L42	10,20 ± 0,17 <sup>ab*</sup>	14,25 ± 0,04 <sup>f</sup>	39,0 ± 2,64 <sup>abc*</sup>
L32	10,01 ± 0,17 <sup>abc*</sup>	9,58 ± 0,03 <sup>l</sup>	30,33 ± 0,58 <sup>bcd</sup>
L131	9,54 ± 0,09 <sup>cd*</sup>	14,38 ± 0,03 <sup>e</sup>	28,33 ± 2,89 <sup>cde</sup>
L13	9,14 ± 0,11 <sup>de*</sup>	16,93 ± 0,02 <sup>b*</sup>	38,33 ± 2,89 <sup>abc*</sup>
L36	8,95 ± 0,05 <sup>e</sup>	9,65 ± 0,02 <sup>l</sup>	33,67 ± 1,53 <sup>abcd *</sup>
L10	9,01 ± 0,02 <sup>e*</sup>	12,97 ± 0,03 <sup>h</sup>	24,33 ± 5,13 <sup>de</sup>
L19	8,46 ± 0,15 <sup>f</sup>	14,47 ± 0,02 <sup>e</sup>	18,33 ± 2,89 <sup>e</sup>
L35	8,10 ± 0,17 <sup>f</sup>	10,27 ± 0,02 <sup>k</sup>	30,67 ± 2,52 <sup>bcd</sup>
<b>C65 (Control)</b>	10,26 ± 0,25 <sup>a*</sup>	21,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	-

Nota: Letras diferentes en una misma columna indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD (p<0,01). Las cepas marcadas con (\*) se consideran las de mejor desempeño en cada ensayo.

Una propiedad que debe caracterizar a los probióticos es la alta tasa de crecimiento. Estos microorganismos deben aplicarse en cantidades suficientes para llegar al

tracto gastrointestinal, 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).

En relación a la producción de ácidos orgánicos, se verificó la capacidad que tienen todos los aislados de producir estas sustancias con efecto antimicrobiano. La cepa L13 alcanzó el mayor valor (16,93 g.L<sup>-1</sup>), mientras que la L32 (9,58 g.L<sup>-1</sup>) manifestó la menor ( $p < 0,01$ ) producción de ácidos

Estudios realizados por Urcan *et al.* (2024a) reportan diferencias en el perfil de producción de ácido láctico en tres cepas de BAL, promisorias para emplearse como probióticos en la apicultura. *L. plantarum* produjo los niveles más altos de este compuesto correspondiente a 17,42 g.L<sup>-1</sup> seguido de *L. acidophilus* con 10,34 g.L<sup>-1</sup>. En relación a *Apilactobacillus kunkeii*, solo se obtuvieron 4,17 g.L<sup>-1</sup>, resultado que es inferior a los obtenidos para todas las cepas analizadas en este estudio. El cultivo mixto de estas tres cepas disminuyó la producción total de ácido láctico con un valor de 10,16 g.L<sup>-1</sup>, lo que resalta la complejidad de la dinámica microbiana en co-cultivos, donde las interacciones competitivas o inhibitorias pueden afectar la productividad metabólica (Oana *et al.*, 2023).

Los lactobacilos que se seleccionen como probióticos deben producir elevadas concentraciones de ácidos orgánicos, pues esta es una condición necesaria para la eliminación de patógenos en el tracto gastrointestinal. Se conoce además que la disminución del pH que se produce en esta cavidad acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Rodríguez *et al.*, 2021).

Todas las cepas seleccionadas tuvieron actividad antimicrobiana frente a *P. larvae*. De ellas las mejores fueron: L31, L6, L24, L42, L13, L34 y L36 cuyos diámetros estuvieron entre 33,67-43,33 mm (tabla 1). Estos resultados superan a los reportados por Rodríguez *et al.* (2021), quienes utilizaron el mismo método para la realización de este ensayo. En su estudio, se midieron halos de 14,83 mm y 12 mm

para *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 respectivamente, aisladas del tracto digestivo de *A. mellifera*.

Dengiz *et al.* (2025) reportaron un ensayo con halos de inhibición de menor diámetro cuando estudiaron el potencial antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* frente a cepas diferentes de este patógeno. Un total de 28 cepas (~26%) exhibieron una inhibición de 21 mm contra al menos dos aislados de *P. larvae*, mientras que 12 mostraron una inhibición moderada (16-20 mm) contra las cuatro variantes de esta bacteria. Estos resultados subrayan la dependencia de la cepa en la actividad antimicrobiana y resaltan la importancia de seleccionar microorganismos probióticos con amplio espectro de inhibición de patógenos para favorecer la salud de las abejas melíferas.

Investigaciones realizadas por Daisley *et al.* (2020b), con un consorcio comercial de lactobacilos llamado BioPatty (compuesto por *L. plantarum* Lp39, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. kunkeei* BR-1) manifestaron una reducción de la infección de *P. larvae* tanto en colmenas como en larvas infectadas a nivel de laboratorio.

Arredondo *et al.* (2018), estudiaron la acción benéfica de una mezcla de cuatro cepas de *L. kunkeei* en larvas y abejas adultas. 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 *N. ceranae* en abejas melíferas adultas. Estos resultados sugieren que las mezclas probióticas pueden ser una estrategia atractiva para mejorar la salud de las abejas.

La actividad antimicrobiana del género *Lactobacillus* se asocia con diversos factores, entre los que se destacan la producción de metabolitos como el ácido láctico, bacteriocinas o el peróxido de hidrógeno, que actúan en la membrana plasmática de otros microorganismos. Estas sustancias son un criterio a tener en cuenta en el momento de elegir una cepa probiótica, por su capacidad de controlar patógenos en el tracto gastrointestinal.

A partir de la coincidencia en los criterios de selección empleados en estos tres ensayos y su correspondiente análisis estadístico, se seleccionaron las mejores cepas candidatas a probióticos que continuarían a la próxima etapa de investigación: L13, L31, L6, L34, L42 y L24.

La hidrofobicidad celular es una estimación indirecta de la adhesión y colonización exitosa de los probióticos a las células epiteliales del intestino. Las bacterias al tener esta propiedad, pueden aumentar sus posibilidades de supervivencia en el tracto gastrointestinal y ejercer efectos positivos en la salud del huésped (Shehata *et al.*, 2024). En la tabla 2 se aprecian los resultados de esta prueba para las cepas evaluadas. Se comprobó que todas presentan clasificación alta frente al xileno y el tolueno, excepto la cepa L34 que alcanzó una clasificación media para el último solvente orgánico mencionado.

Tabla 2. Hidrofobicidad de *Lactobacillus* spp. con xileno y tolueno como solventes orgánicos.

Cepas	Xileno	Tolueno
<b>L6</b>	99,86 ± 0,02 <sup>a*</sup>	99,14 ± 0,03 <sup>b*</sup>
<b>L13</b>	99,47 ± 0,03 <sup>ab*</sup>	99,06 ± 0,03 <sup>b*</sup>
<b>L24</b>	98,26 ± 0,1 <sup>b*</sup>	99,85 ± 0,03 <sup>a*</sup>
<b>L31</b>	95,30 ± 0,29 <sup>c*</sup>	98,07 ± 0,09 <sup>c*</sup>
<b>L34</b>	67,82 ± 0,23 <sup>d*</sup>	34,79 ± 0,03 <sup>e</sup>
<b>L42</b>	99,36 ± 0,06 <sup>ab*</sup>	55,30 ± 0,08 <sup>d*</sup>

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

Nota: Letras distintas indican diferencias entre las cepas según Prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $p < 0,01$ ). Las cepas marcadas con (\*) se consideran las de mejor desempeño en cada ensayo.

Los datos obtenidos en esta investigación en cuanto al xileno superan a los detectados por Meradji *et al.* (2023), quien analizó esta propiedad para una cepa de *L. kimbladii kullabergensis* procedente de *A. mellifera intermissa*. Los valores

medidos fueron de 83,40%. Otros investigadores también reportan resultados inferiores en cuanto a este solvente (Mohammad *et al.*, 2020).

Shehata *et al.* (2024), utilizaron el xileno y el tolueno en BAL. Los datos máximos alcanzados correspondieron a la cepa de *L. plantarum* HBMSS3 con 65,33% para el xileno y 56,36% para el tolueno. Estos resultados difieren a los observados en este ensayo para el primer solvente; sin embargo, en el caso del segundo fueron superiores a los obtenidos para L34 y L42.

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 comprobó que las cepas L6, L13, L24, L31 y L42 tienen una alta hidrofobicidad, por lo que se deduce que estas tienen mayores posibilidades de adherirse a la mucosa intestinal.

Los microorganismos probióticos se utilizan para mejorar la salud intestinal y estimular el sistema inmunológico, por lo que un criterio a tener en cuenta en su selección es determinar si existe la posibilidad de transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino. Este fenómeno, constituye un problema de salud a nivel mundial, por lo que se prefiere que estos candidatos sean sensibles a los antimicrobianos prescritos comúnmente en baja concentración o que la resistencia que exhiban sea inherente al microorganismo (Fernández-Roblero *et al.*, 2020).

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos para este ensayo. Se observa sensibilidad en todos los antibióticos probados excepto para la kanamicina donde L24, L31, L34 y L42 son resistentes. Se conoce que las bacterias lácticas presentan resistencia a la amikacina, oxacilina y vancomicina, lo que se considera para el género *Lactobacillus* como resistencia intrínseca. En el caso de la kanamicina, esta

conducta se debe a la falta de un sistema de transporte activo eficiente para los aminoglucósidos en la membrana celular (Mohammad *et al.*, 2020).

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* spp.

<b>Antibióticos</b>	<b>L6</b>	<b>L13</b>	<b>L24</b>	<b>L31</b>	<b>L34</b>	<b>L42</b>
<b>AMP</b>	S	S	S	S	S	S
<b>AMS</b>	S	S	S	S	S	S
<b>BACIT</b>	S	S	S	S	S	S
<b>CFT</b>	S	S	S	S	S	S
<b>CLOR</b>	S	S	S	S	S	S
<b>DXT</b>	S	S	S	S	S	S
<b>E</b>	S	S	S	S	S	S
<b>FEP</b>	S	S	S	S	S	S
<b>K</b>	S	S	R	R	R	R
<b>OX</b>	S	S	S	S	S	S
<b>P</b>	S	S	S	S	S	S
<b>PRL</b>	S	S	S	S	S	S
<b>TE</b>	S	S	S	S	S	S

S: Susceptible, R: Resistente.

Elzeini *et al.* (2021) realizaron esta prueba para las especies de *L. brevis* HBE2 y *L. casei* HBE5, entre otras bacterias aisladas del tracto digestivo de *A. mellifera*. En su investigación, las cepas fueron resistentes a la ampicilina, la vancomicina y la kanamicina, resultado que concuerda con el presente estudio solo para el último antibiótico. Existe similitud en cuanto a sensibilidad para el cloranfenicol.

Goh *et al.* (2021) estudiaron bacterias aisladas de tres especies de abejas sin aguijón en Saba y observaron un patrón de resistencia en la mayoría de antibióticos probados. Sin embargo, la especie *L. pentosus* mostró sensibilidad a la ampicilina y el cloranfenicol, datos análogos a los encontrados en el presente trabajo.

*A. mellifera* consume altas concentraciones de azúcares a través del néctar y la miel que adquiere en su dieta. En Cuba en los meses de agosto a septiembre (correspondiente al período de hambruna), los apicultores les suministran a las abejas un jarabe con azúcar de caña para su sostenimiento, en concentraciones de 1000 g.L<sup>-1</sup>. Por ambos motivos es importante que los microorganismos a emplear en el diseño de productos probióticos para abejas, tengan la capacidad de sobrevivir en estas condiciones, pues ellos se aplican generalmente en el alimento.

En la tabla 4, se evidencian los resultados de la supervivencia en el jarabe. La concentración inicial fue de 5 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Al transcurrir las 72 horas, los aislados que pudieron resistir a la concentración 1000 g.L<sup>-1</sup> fueron: L31, L13 y L34. De ellos, L31 fue la que alcanzó mayor viabilidad en el orden de 4 Log UFC. mL<sup>-1</sup>. Para el jarabe con una concentración fue de 2000 g.L<sup>-1</sup> no se observó crecimiento en ningún caso.

Tabla 4. Resistencia osmótica al jarabe de las cepas de *Lactobacillus* spp.

Tiempo (h)	Log UFC. mL <sup>-1</sup>		
	L31	L34	L13
0	5,87± 0,15 <sup>a</sup>	5,59± 0,11 <sup>a</sup>	5,63± 0,05 <sup>a</sup>
72	4,12± 0,34 <sup>a*</sup>	2,77± 0,42 <sup>b</sup>	3,27± 0,25 <sup>b</sup>
Tiempo (h)	L6	L24	L42
0	5,56± 0,07 <sup>a</sup>	5,59± 0,11 <sup>a</sup>	5,46± 0,15 <sup>a</sup>
72	1,46± 0,15 <sup>c</sup>	1,17± 0,29 <sup>c</sup>	1,17± 0,29 <sup>c</sup>

Nota: Letras diferentes en una misma fila indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD (p<0,01). La cepa marcada con (\*) se considera la de mejor desempeño.

Este reporte supera al informado por Audisio & Benitez-Ahrendts (2011) quienes evaluaron la supervivencia de una cepa de *L. johnsonii* a concentraciones de azúcar de 125, 250 y 500 g.L<sup>-1</sup>. Estos autores observaron que la cepa no perdía viabilidad a las 24 h cuando se inoculó en el jarabe de 125 g. L<sup>-1</sup>, mientras que en

mayores concentraciones, no había crecimiento ( $500 \text{ g.L}^{-1}$ ) o se veía muy disminuido ( $250 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Un mejor comportamiento obtuvo Arredondo (2015), quien evaluó la supervivencia de los aislamientos bajo concentraciones de azúcar similares y dos valores de temperatura ( $28^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ ). La mayoría fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones y temperaturas utilizadas. Se detectó una mayor supervivencia de los aislamientos incubados durante 72 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esto indica que los apicultores podrían preparar el jarabe con el probiótico y almacenarlo a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta 3 días antes de utilizarlo.

Urcan *et al.* (2024a) detectaron que *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *A. kunkeii* mantuvieron una alta densidad celular en el jarabe de azúcar durante siete días, en comparación con los de glucosa y fructosa. Las mejores tasas de supervivencia se observaron en los siropes con concentraciones de carbohidratos inferiores a 55%, lo que sugiere que los jarabes comerciales podrían necesitar dilución antes de usarse para administrar la mezcla probiótica.

En un estudio realizado por Leska *et al.* (2023) se evaluó la viabilidad de diez cepas de BAL aisladas y una cepa de referencia, *A. kunkeii* DSM 12361, en jarabes con diferentes concentraciones de glucosa, fructosa o sacarosa. Los resultados mostraron una mejor tasa de supervivencia de BAL en el jarabe con glucosa y fructosa sin sacarosa.

Otras investigaciones también demuestran la tolerancia a altas concentraciones de azúcar de cepas de BAL. Iorizzo *et al.* (2022) utilizó dos siropes durante 48 h a  $20^{\circ}\text{C}$  para estudiar la supervivencia de cinco cepas de *L. plantarum* añadidas con una concentración celular inicial de  $7 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ . En el jarabe A (compuesto por 40% de glucosa + 20% de fructosa), después del tiempo en estudio, las cepas mostraron una reducción entre  $3,22$ - $5,84 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ . En el jarabe B (compuesto por 50% de sacarosa), la reducción fue de dos unidades de logaritmo con respecto a la

concentración inicial. Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores con respecto a la cepa *Lactobacillus* L31, quien solo disminuyó una unidad de logaritmo con respecto a la concentración inicial en 72 h.

No todas las cepas del género *Lactobacillus* muestran la misma capacidad para adaptarse a los ambientes con alta osmolaridad. La resistencia que manifiesta la cepa *Lactobacillus* L31 pudiera asociarse a la acumulación de solutos compatibles (osmoprotectores) en su citoplasma. Entre ellos se encuentra el glicerol, la trehalosa, glicina betaína, prolina, glutamato, azúcares y polioles. Estos compuestos retienen agua en la célula y mantienen el equilibrio osmótico intracelular, la presión de turgencia, el volumen celular y la concentración de electrolitos, además de estabilizar la función enzimática (Sionek *et al.*, 2024).

Después de analizar los resultados de los ensayos se decidió seleccionar a la cepa *Lactobacillus* L31 como la más promisoría como probiótica para abejas, ya que posee una alta capacidad de crecimiento y produce elevadas concentraciones de ácidos orgánicos. También mostró efecto inhibitorio frente a *P. larvae* y resistió las condiciones osmóticas del jarabe.

### **Conclusiones parciales**

1. Las cepas de *Lactobacillus* L6, L24, L31, L42, L13, L34 y L36, aisladas del tracto digestivo de *M. beecheii*, inhibieron el crecimiento de *P. larvae* con halos de inhibición superiores a los 33 mm.
2. La cepa *Lactobacillus* L31 posee propiedades probióticas que demuestran su potencial para utilizarse en la elaboración de un biopreparado que mejore la salud de las abejas.

## *Capítulo 4*

## **CAPÍTULO 4. DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* L31 Y DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL BIOPREPARADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO.**

### **Introducción**

Entre los medios más empleados para la obtención de biomasa de *Lactobacillus* spp. en condiciones de laboratorio se encuentra el caldo MRS (De Man *et al.*, 1960), sin embargo, su costo se eleva cuando se produce a una escala mayor para obtener grandes volúmenes y producir un probiótico comercial (Santos *et al.*, 2016). Debido a esta situación, la selección de medios adecuados y económicos para las producciones industriales es un aspecto importante en la obtención de estos biopreparados. La mayoría de las investigaciones se enfocan, según la cepa que se utilice, en la optimización de los medios por la metodología de superficie de respuesta, a través de la sustitución de las fuentes de carbono y de nitrógeno por materias primas de bajo costo y alta disponibilidad (Sosa *et al.*, 2018).

Por lo anterior, el presente capítulo tuvo como objetivos:

- ✓ Formular un medio de cultivo con componentes nacionales para el crecimiento de *Lactobacillus* L31.
- ✓ Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa en el nuevo medio de cultivo.
- ✓ Determinar la estabilidad del biopreparado obtenido a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración.

### **Materiales y métodos específicos**

#### **4.1 Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31**

##### **Inóculo microbiano**

Para realizar la optimización del medio de cultivo, el inóculo se obtuvo a partir de un cultivo de *Lactobacillus* L31 en caldo MRS con 18 h de incubación a 37°C en

condiciones estáticas. La concentración microbiana que se obtuvo fue de  $10^9$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

#### 4.1.1 Diseño del medio de cultivo y condiciones de fermentación

Para diseñar el nuevo medio de cultivo se tomó como medio de referencia el caldo MRS cuya composición se describe en el epígrafe 2.1.3. En dicha formulación se realizó la sustitución de la fuente de carbono (dextrosa) por miel final de caña de azúcar y las fuentes de nitrógeno (peptona, extracto de carne y extracto de levadura) por un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (HELSc), el que se elaboró con la metodología propuesta por Pérez (2000). El citrato de amonio y el acetato de sodio se excluyeron de la fórmula, pues solo actúan como inhibidores de los estreptococos y otros microorganismos contaminantes y elevarían el precio del nuevo medio de cultivo.

La composición del medio que se diseñó para el crecimiento de *Lactobacillus* L31 (MCL31) se expresa en la tabla 5.

Tabla 5. Formulación del medio MCL31.

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

pH: 6,5 ± 0,2.

#### 4.1.2 Diseño experimental

Se empleó el método de superficie respuesta (Box *et al.*, 1978) con un diseño experimental compuesto central rotativo 2<sup>3</sup> y tres repeticiones en el centro del plan. Las variables independientes fueron: azúcares reductores totales (X<sub>1</sub>), nitrógeno

total ( $X_2$ ) y volumen del inóculo ( $X_3$ ). La variable respuesta ( $Y$ ) fue el conteo de las UFC.mL<sup>-1</sup>.

A partir de la definición de los niveles de las variables independientes (tabla 6), se empleó el programa *Statgraphics Centurion 19.1.1* sobre Windows para crear el diseño de la matriz codificada, que muestra las combinaciones que debían ejecutarse. El programa también desarrolla un análisis de regresión múltiple para obtener una ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{123}X_1X_2X_3.$$

Tabla 6. Niveles de azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) e inóculo a emplear en el diseño experimental.

Factor	Mínimo (-1)	Medio (0)	Máximo (1)
$X_1$ : ART (g.L <sup>-1</sup> )	15	20	25
$X_2$ : NT (g.L <sup>-1</sup> )	2	3	4
$X_3$ : volumen del inóculo (mL)	50	100	150

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

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

Donde  $N_{exp}$  = Número de experimentos,  $k$  = Número de variables independientes,  $2k$  = Número de puntos estrellas del experimento (son los experimentos que se desarrollan en una zona alejada del centro de este) y  $N_0$  = Número de puntos en el centro del plan. Al sustituir por los datos del presente diseño se obtuvo que:  $N_{exp} = 2^3 + 2 \cdot 3 + 2 = 16$  experimentos.

#### 4.1.3 Procedimiento experimental

En cada corrida experimental se utilizaron erlenmeyers (100 mL de volumen efectivo) con las concentraciones de las variables independientes según la matriz

codificada. Se ajustó en cada uno el pH inicial de la fermentación (6,5) y se procedió a su esterilización (15 min a 1,5 atm). Posteriormente, se inocularon con el cultivo *Lactobacillus* L31 de acuerdo a los volúmenes de inóculo establecidos y una vez que transcurrieron 24 h a 37°C, se tomaron muestras del biopreparado para realizar el conteo de las UFC a través del método de las diluciones seriadas (ver epígrafe 2.3.2).

#### 4.1.4 Análisis estadístico y decodificación de las variables

Los resultados del conteo de las UFC.mL<sup>-1</sup> se transformaron a LN. Se evaluó la significación de cada uno de los parámetros del modelo y se determinó la superficie de respuesta con el uso del programa *Statgraphics Centurion 19.1.1* sobre Windows. A partir del modelo, se determinaron los valores óptimos de las variables independientes.

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

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

Donde X<sub>C</sub> = variable codificada y X<sub>D</sub> = variable decodificada.

#### 4.2 Estudio de la cinética de crecimiento y disminución del pH de la cepa *Lactobacillus* L31 en el nuevo medio de cultivo

En este ensayo, se modeló el crecimiento de la cepa en estudio en el caldo MRS (medio de referencia) y en el nuevo medio de cultivo (MCL31). A partir de un cultivo de 18 horas (9 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) en caldo MRS, las cepas se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en 21 frascos que contenían 100 mL de caldo MRS y en 21 frascos que contenían 100 mL de MCL31 ajustados a pH 6,5. Los cultivos se incubaron a 37°C en condiciones estáticas. Los muestreos se realizaron cada 4 h (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) con tres réplicas por cada tiempo, las que se retiraron en el momento de aplicación de las técnicas de análisis.

**Crecimiento microbiano:** El conteo de las UFC para cada tiempo de muestreo se realizó por el método de las diluciones seriadas (ver epígrafe 2.3.2).

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

**Determinación del pH:** A cada muestra se le midió el pH como se describe en el epígrafe 2.4.1.

#### 4.2.1 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó según el epígrafe 2.6. Los conteos de las UFC.mL<sup>-1</sup> no cumplieron con los supuestos teóricos del ANOVA, por lo que se empleó la transformación a Log para lograr el cumplimiento de los mismos. El análisis de varianza se realizó para determinar la presencia de diferencias en la cinética de crecimiento entre las diferentes horas de muestreo (0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) para cada uno de los medios de cultivo (MRS y MCL31) y en el pH alcanzado en cada medio de cultivo.

#### 4.3 Estudio de la estabilidad del biopreparado bajo condiciones de almacenamiento

##### 4.3.1 Diseño experimental y condiciones de cultivo del biopreparado

Para definir la estabilidad de este producto biológico se utilizó la metodología descrita por Rondón (2009). Se desarrolló un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 9x2 (nueve momentos de muestreo: 1, 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días con dos temperaturas: 4°C y temperatura ambiente) y tres

repeticiones. El inóculo se obtuvo a partir de un cultivo de *Lactobacillus* L31 en caldo MRS por 18 h a 37°C en condiciones estáticas. El microorganismo se inoculó en 54 frascos de 500 mL de capacidad con caldo MCL31 ajustado a pH 6,5, los que se mantuvieron a 37°C por 48 h. Pasado el período de incubación, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y refrigeración (4°C) hasta 180 días. En cada tiempo de muestreo se realizó el conteo de viables (ver epígrafe 2.3.2) y se determinó el pH (ver epígrafe 2.4.1).

#### **4.3.2 Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó según el epígrafe 2.6. Se utilizó un análisis de varianza simple para determinar la presencia de diferencias en el conteo de viables y el pH en las dos temperaturas estudiadas.

### **Resultados y discusión**

#### **Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31**

En la tabla 7, se presenta la matriz codificada con cada una de las combinaciones (16) y se reflejan los resultados que se obtuvieron para el conteo de las UFC.mL<sup>-1</sup> (expresado en LN UFC.mL<sup>-1</sup>).

A partir del programa *Statgraphics Centurion* 19.1.1 sobre Windows se desarrolló el análisis de los resultados. El modelo estimó, según los datos experimentales, que el conteo de las UFC.mL<sup>-1</sup> tuvo un valor máximo cuando X<sub>1</sub> (ART), X<sub>2</sub> (NT) y X<sub>3</sub> (volumen del inóculo) presentaban las concentraciones óptimas que se muestran en la tabla 8.

Tabla 7. Matriz codificada y resultados del conteo de UFC.mL<sup>-1</sup> (transformados a LN) para el cultivo de la cepa *Lactobacillus* L31 según diseño compuesto central rotativo.

	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	LN UFC.mL <sup>-1</sup>		
	(ART)	(NT)	(INÓCULO)	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3
1	20	3	15,9	22,12	22,62	22,82
2	28,4	3	100	27,98	27,38	27,28
3	25	4	50	24,89	24,89	24,59
4	15	4	150	24,89	24,46	24,39
5	15	2	150	24,67	24,97	24,47
6	11,59	3	100	22,56	22,46	22,16
7	15	2	50	22,56	22,36	22,46
8	20	1,32	100	26,67	26,51	26,37
9	25	2	50	25,54	25,21	25,94
10	20	3	100	27,45	27,12	27,65
11	20	4,68	100	27,98	27,58	27,78
12	25	4	150	26,83	26,13	26,63
13	25	2	150	24,78	24,98	24,28
14	20	3	100	27,98	27,33	27,68
15	15	4	50	22,89	22,19	22,99
16	20	3	184,09	25,76	25,12	25,26

Tabla 8. Valores óptimos de cada variable en el medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31.

Variable	Óptimo
X1: Azúcares reductores totales (g.L-1)	22,63
X2: Nitrógeno total (g.L-1)	3,61
X3: Inóculo (mL)	111,7

En la figura 6, se aprecian los valores óptimos para cada uno de los factores, observándose la concavidad en los máximos. La tabla ANOVA presentada en el Anexo 2 divide la variabilidad de LN UFC.mL<sup>-1</sup> en partes, separadas en piezas para cada uno de los efectos. A continuación, prueba el significado estadístico de cada efecto al comparar el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso, cuatro efectos tienen valores de P inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes (95,0% de nivel de confianza).

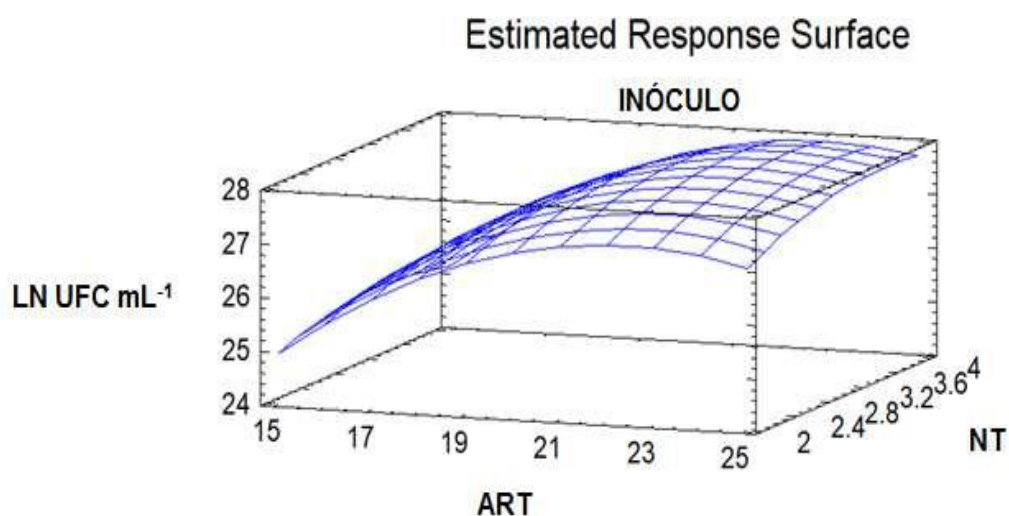


Figura 6. Influencia de los azúcares reductores totales (ART), nitrógeno total (NT) y el inóculo en la variable respuesta LN UFC.mL<sup>-1</sup> de la cepa *Lactobacillus* L31.

El estadístico  $R^2$  indica que el modelo ajustado explica 90,86% de la variabilidad en LN UFC.mL<sup>-1</sup>. El estadístico  $R^2$  ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, fue de 88,69%. El error estándar de la estimación muestra la desviación estándar de los residuos igual a 0,66. El error absoluto medio (MAE) fue de 0,47, es el valor promedio de los residuos. La estadística de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si existe alguna correlación significativa basada en el orden en que

ocurren en el archivo de datos. Dado que el valor P es inferior a 0,05, hay una indicación de posible correlación.

Este panel muestra la ecuación de regresión que se ajustó a los datos. La ecuación del modelo ajustado es:  $Var_1 = -5.00621 + 2.04337 * Factor_A + 1.02239 * Factor_B + 1.44991 * Factor_C - 0.0430236 * Factor_A^2 + 0.02425 * Factor_A * Factor_B - 0.0163833 * Factor_A * Factor_C - 0.305444 * Factor_B^2 + 0.05675 * Factor_B * Factor_C - 0.0574488 * Factor_C^2$

Como resultado final, en la tabla 9 se muestra la composición del medio MCL31 que se obtuvo para elaborar un litro del biopreparado. Las investigaciones encaminadas al diseño de medios de cultivo que alcancen elevadas concentraciones microbianas ( $>10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) son elementos importantes en el desarrollo de bacterias lácticas como probióticos (Sosa-Cossio *et al.*, 2025). Los lactobacilos requieren medios complejos con diversos aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y carbohidratos fermentables, que estimulan su crecimiento (Liew *et al.*, 2005).

Tabla 9. Composición del medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31 (MCL31).

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Miel final de caña (36% de ART)	62,86
HELSc (8,8% de NT)	41,02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,02

pH: 6,5 ± 0,2. Volumen de inóculo: 111,7 mL.L<sup>-1</sup>

La formulación del nuevo medio de cultivo se condujo principalmente para la composición de fuentes de carbono y nitrógeno. Se conoce que la miel final de caña de azúcar posee como constituyente sacarosa, glucosa y fructosa (Sosa *et al.*, 2018). Estos aportan altas concentraciones de ART, los cuales pueden

utilizarse por los microorganismos como fuente de energía. Por su parte el hidrolizado de levaduras presenta en su composición 8,8% de NT, por lo que constituye una alternativa para la incorporación de fuentes nitrogenadas en los medios de cultivo. En Cuba, Milián *et al.* (2004) validaron este hidrolizado como sustituto del extracto de levadura en diferentes medios de cultivo microbiológicos, entre los que se encontraba el medio MRS para el cultivo de lactobacilos.

Se reconoce por otros investigadores que los biopreparados probióticos deben presentar una concentración de  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> para aplicarse en los animales (Brizuela, 2003). En el presente experimento se obtuvieron conteos de viables superiores a 12 Log UFC.mL<sup>-1</sup> a las 24 h, por lo tanto, las concentraciones de ART y NT que se estimaron, resultaron óptimas para producir el medio de cultivo que posteriormente se utilizará en la elaboración del biopreparado. Resultados similares a los obtenidos en este estudio se reportaron por Vera *et al.* (2021).

### **Estudio de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* L31**

En la figura 7 se observa que el MCL31 resultó ser un medio de cultivo eficaz para el crecimiento de la bacteria. Al comparar el crecimiento de *Lactobacillus* L31 en este sustrato con respecto al que se obtuvo en el medio de referencia MRS, solo se observan diferencias a las 4 y 8 h del crecimiento ( $P < 0,01$ ). Estos resultados indican que los componentes del MCL31 como: la miel final de caña de azúcar (rica en azúcares fermentables), las sales minerales (calcio, fósforo y magnesio) y el hidrolizado enzimático de levaduras (aporta aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y oligosacáridos de glucano y manano), suplieron los requerimientos nutricionales de los lactobacilos de forma similar al medio MRS (Pérez, 2000; Sosa *et al.*, 2018).

Se corroboró que a las 4 horas, la cepa se encontraba en la fase exponencial en ambos medios y que esta etapa se prolonga más allá de las 24 horas, aunque se detectan diferencias a las 4 y 8 h. Estos contrastes se relacionan con la adaptación de *Lactobacillus* L31 al nuevo sustrato presente en el MCL31, ya que el inóculo inicial se desarrolló en el MRS. Resulta importante definir estos resultados, ya que

son determinantes en el establecimiento del tiempo que debe activarse el cultivo a escala de laboratorio para obtener la población de células probióticas necesarias.

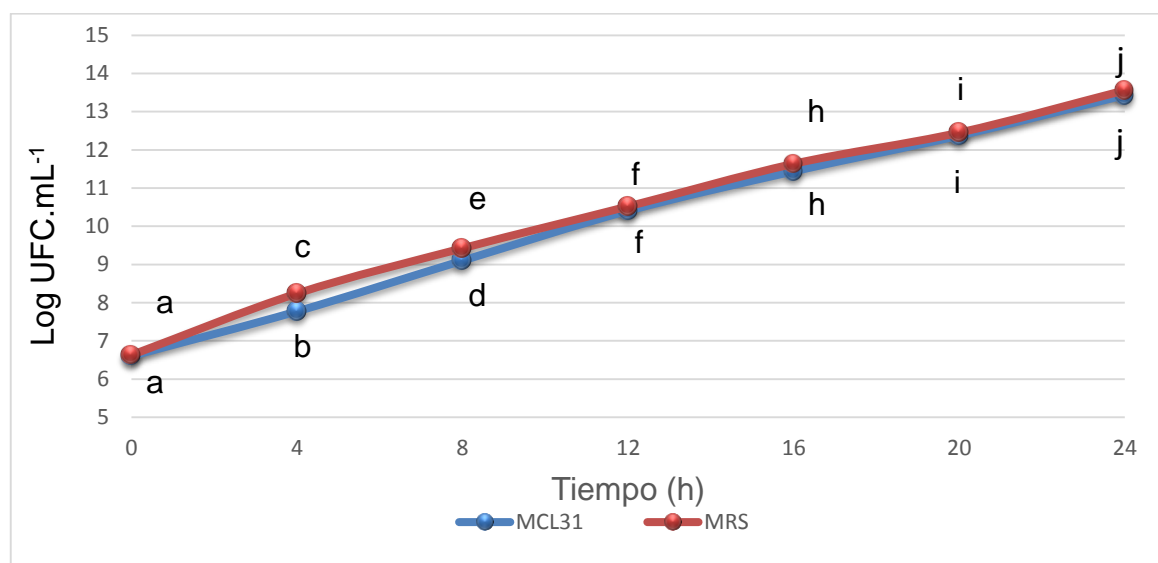


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus* L31 en los medios MRS y MCL31.

Hora 0:  $P = 0,2503$  y  $\pm EE = 0,007$ ; Hora 4:  $P = 0,0078$  y  $\pm EE = 0,013$ ; Hora 8:  $P = 0,0056$  y  $\pm EE = 0,024$ ; Hora 12:  $P = 0,0678$  y  $\pm EE = 0,01$ ; Hora 16:  $P=0,3112$ ,  $EE: 0,034$ ; Hora 20:  $P= 0,1412$ ,  $EE: 0,054$ ; Hora 24:  $P = 0,3940$  y  $\pm EE = 0,023$ . Letras diferentes indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $p < 0,01$ ).

Los resultados anteriores son superiores a los reportados en varios estudios donde utilizaron la melaza de caña de azúcar para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos probióticos; entre ellos, se encuentran los publicados por Acosta-Piantini *et al.* (2023) quienes emplearon la melaza de caña de azúcar pretratada como medio de fermentación para producir biomasa de la cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 (LPPF19). Estos autores observaron una viabilidad celular de  $9,58 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  y demostraron que era un medio económico para producir este microorganismo a escalas productivas. Chin *et al.* (2024) obtuvieron altas concentraciones de una cepa de *Lactobacillus acidophilus* en un medio optimizado, a base de melaza de caña y de extracto de levadura.

En las figuras 8 y 9, se muestran las líneas de tendencia con sus respectivas ecuaciones de regresión y los valores de  $R^2$  del cultivo de *Lactobacillus* L31 en los medios MCL31 y MRS.

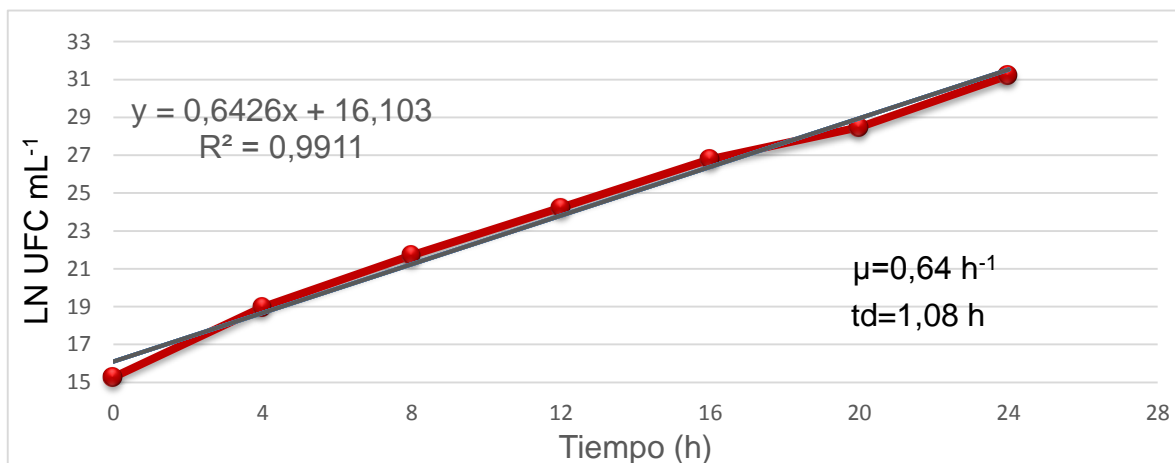


Figura 8. Gráfico de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento en el medio MRS ( $P < 0,01$ ).

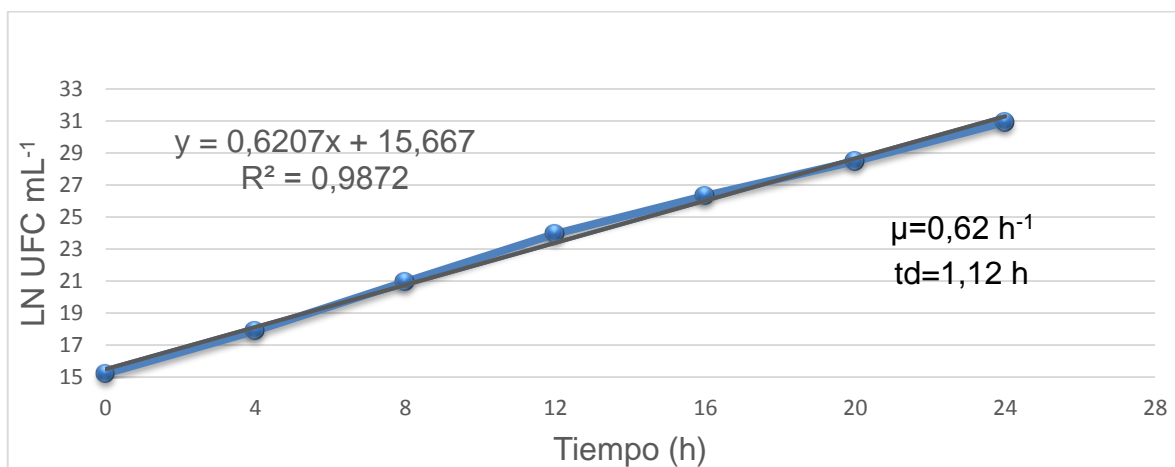


Figura 9. Gráfico de dispersión y aplicación de la línea de ajuste para la determinación de la velocidad de crecimiento en el medio MCL31 ( $P < 0,01$ ).

En la tabla 10 se presentan los resultados del cálculo de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de *Lactobacillus* L31 en los medios de cultivos que se emplearon. Los resultados confirman que la sustitución de las fuentes de nitrógeno y carbono por materias primas menos puras y más asequibles, no produjo una

afectación sensible de la concentración de la población microbiana ni en la velocidad de crecimiento de la bacteria.

Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de *Lactobacillus* L31 en los medios MRS y MCL31.

Cepa	Medios	Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )	Tiempo de duplicación (td)	R <sup>2</sup>
L31	MRS	0,64 h <sup>-1</sup> ± 0,025	1,08 h ± 0,025	0,99
	MCL31	0,62 h <sup>-1</sup> ± 0,024	1,12 h ± 0,024	0,98

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

En la figura 10, se presentan los resultados correspondientes a la disminución del pH por *Lactobacillus* L31 en los dos medios que se utilizaron. No se observan diferencias en los valores alcanzados al final del ensayo ( $p < 0,01$ ), los cuales fueron 4,23 en el medio MRS y 4,32 en el MCL31, una tendencia que es característica de este género microbiano.

Reportes realizados por otros investigadores reflejan diferencias en cuanto a la cinética de crecimiento y las variaciones de pH del medio por cepas de *Lactobacillus*. El comportamiento del candidato a probiótico *Lactobacillus* 22 LMC en un medio con residuos industriales se estudió por Vera *et al.* (2021). Los sustratos utilizados fueron: melaza de caña de azúcar (20%), suero de leche

(33,0%) y levadura hidrolizada (10,36%) (MLS). Como control se empleó el medio de referencia MRS. En ambos medios se alcanzaron concentraciones celulares superiores a  $12 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  a las 48 h. Con la utilización del MCL31, estos resultados se alcanzan aproximadamente entre las 18-20 h. Con respecto al pH, este autor observó un patrón más ácido con una disminución del pH de 6,5 a 3,11 en el medio MLS y de 6,5 a 4,01 en el medio comercial.

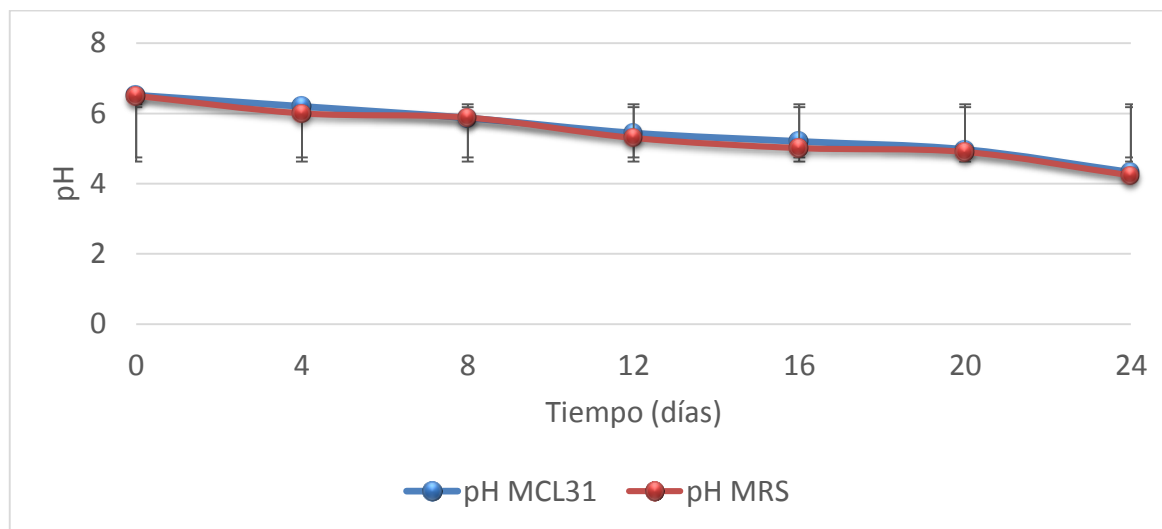


Figura 10. Comportamiento del pH durante la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* L31 en el medio MRS y el MCL31 ( $p > 0,01$ ). Las barras representan la desviación estándar.

Sosa-Cossio *et al.* (2025) diseñaron medios de cultivo económicos para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31. Para ello formularon cinco medios (M2, M3, M4, M5 y M6) a partir de la composición del medio tradicional MRS y se sustituyeron las fuentes de carbono y de nitrógeno por melaza de caña y urea, respectivamente. Los resultados mostraron que LB-31 tuvo su mayor concentración a las 12 h, con  $8,72 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  en el medio M4, sin diferencias con el medio control. Las velocidades específicas máximas de crecimiento fueron inferiores en todos los medios con respecto al control y, consecuentemente, el tiempo de duplicación de la biomasa fue superior. El pH disminuyó en todos los medios hasta valores inferiores a 3,9 y LB-31 fue capaz de producir ácido láctico

(6,61 g.L<sup>-1</sup>), acético (2,51 g.L<sup>-1</sup>) y fórmico (14,87 g.L<sup>-1</sup>) en el medio M4, por lo que este medio pudiera ser una alternativa económica para la obtención del probiótico en estudio.

Torres (2018), evaluó el crecimiento de dos bacterias lácticas probióticas (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469) en un medio formulado con suero lácteo suplementado con extracto de levadura, fibra prebiótica (inulina) y una mezcla prediseñada de minerales y micronutrientes. Se valoró el desempeño del nuevo sustrato con respecto al medio MRS y se tuvo en cuenta la variable rendimiento de biomasa como parámetro de respuesta. *L. casei* mostró un crecimiento máximo de 14,05 Log UFC.mL<sup>-1</sup> en el medio que contenía 2,80 g.L<sup>-1</sup> de inulina y 4,30 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, mientras que en el medio comercial MRS mostró un crecimiento de 14,19 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Para *L. rhamnosus*, el diseño validado de inulina (2,0 g.L<sup>-1</sup>) y extracto de levadura (4,90 g.L<sup>-1</sup>), arrojó un crecimiento máximo de 12,54 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, muy similar al manifestado en el medio de cultivo tradicional, donde creció hasta 12,60 Log UFC.mL<sup>-1</sup>.

Kavak *et al.* (2022) determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de *L. fermentum* NBC-08 a través del Método de Superficie de Respuesta y verificaron la influencia de las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, sales inorgánicas y el Tween 80. Como resultado de este ensayo estos autores concluyeron que los valores óptimos para el desarrollo del microorganismo son: 96,06 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, 40,76 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 19,43 g.L<sup>-1</sup> de sales inorgánicas y 11,01 mL.L<sup>-1</sup> de Tween 80. Bajo estas condiciones el máximo crecimiento que se alcanzó fue de 10,75 Log UFC.mL<sup>-1</sup>.

Myo *et al.* (2025) optimizaron un medio rentable para el cultivo del candidato a probiótico *Lactiplantibacillus plantarum* 22F (L22F). Para ello evaluaron su viabilidad industrial y su perfil metabólico funcional. El medio óptimo comprendía 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa, 14,1 g.L<sup>-1</sup> de proteína de soja y 14,1 g.L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, suplementado con minerales. En la fermentación de 50 L, L22F alcanzó 9,20 Log

UFC.mL<sup>-1</sup> a las 12 h, con un azúcar residual de 1,50 g.L<sup>-1</sup> y un pH de 3,99. Resultados superiores se obtuvieron en el presente trabajo cuando a las 12 h se detectó una población superior a 10 Log UFC.mL<sup>-1</sup>.

El uso de fuentes no convencionales para el desarrollo de medios de cultivos industriales que involucran el crecimiento de *L. rhamnosus* se estudió por De La Rosa *et al.* (2023). Realizaron cinéticas de fermentación durante 24 h con mediciones cada 6 h para 30 combinaciones diferentes de medios de cultivo. El crecimiento óptimo se manifestó cuando utilizaron como sustrato 15,76 g.L<sup>-1</sup> de azúcar, 14,24 g.L<sup>-1</sup> de suero de leche y 10,00 g.L<sup>-1</sup> de leche de soya, alcanzándose una viabilidad similar al medio de cultivo comercial. Con los valores de viabilidad obtenidos se calculó la velocidad de crecimiento microbiano y el valor más alto fue de 0,47 h<sup>-1</sup>. El pH en este medio fue de 4,72, mientras que en el medio de cultivo control se obtuvo una velocidad de crecimiento de 0,30 h<sup>-1</sup> y un valor de pH de 8,07.

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

### **Estudio de la estabilidad del biopreparado bajo condiciones de almacenamiento**

La prueba de estabilidad es la principal herramienta para evaluar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento para productos biológicos. En las figuras 11 y 12 se representa la dinámica del comportamiento de la viabilidad y el pH del cultivo *Lactobacillus* L31 desde el primero hasta los 180 días de muestreo respectivamente.

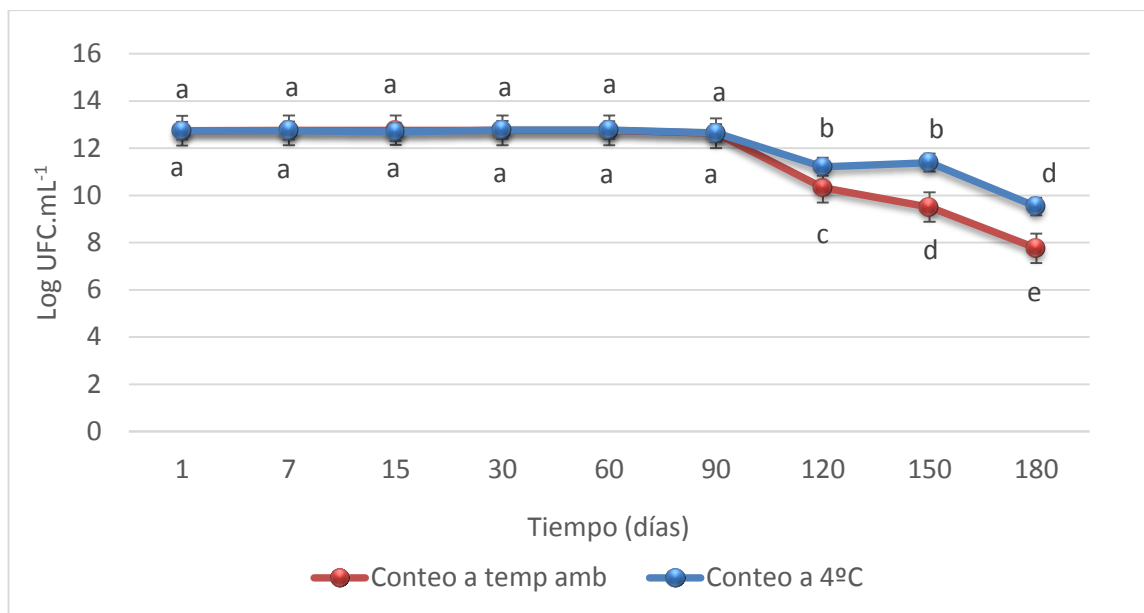


Figura 11. Dinámica del comportamiento de la viabilidad celular del biopreparado *Lactobacillus* L31 durante su almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente (temp amb). Letras diferentes indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HD ( $p < 0,01$ ). Las barras representan el error estándar.

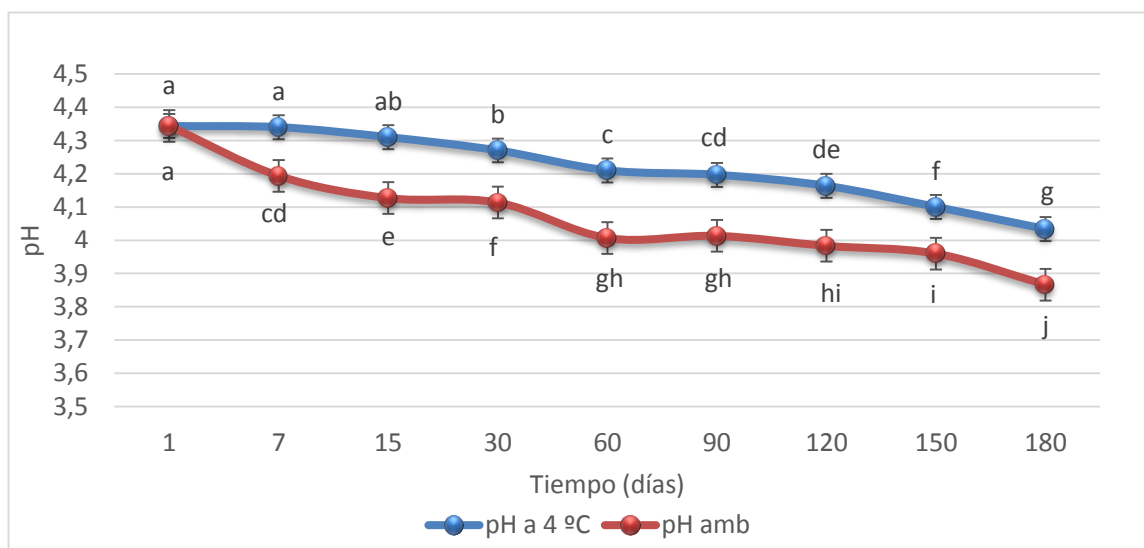


Figura 12. Comportamiento del pH del biopreparado *Lactobacillus* L31 durante su almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente. Letras diferentes indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $p < 0,01$ ). Las barras representan el error estándar.

Hasta los 90 días, el biopreparado mostró estabilidad en el conteo de viables, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración ( $>12 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ) sin diferencias entre las muestras ( $P<0,01$ ); sin embargo, a los 120 días se observó una disminución de la estabilidad con respecto a los conteos iniciales, que se mantuvo por encima de  $7 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  hasta los 180 días al almacenarse en ambas temperaturas. Estos resultados son coherentes con los recomendados por la FAO, quienes consideran que la concentración celular para un alimento probiótico debe estar entre  $6-7 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$  según expresó Betancur *et al.* (2020) en su artículo.

En cuanto al comportamiento del pH, se observan diferencias entre las temperaturas estudiadas. Existe una mayor disminución de este parámetro cuando el biopreparado se encuentra a temperatura ambiente. Esto se debe a que la actividad metabólica de los lactobacilos se incrementa bajo estas condiciones, porque son bacterias mesófilas (temperatura óptima de crecimiento entre  $30-37^{\circ}\text{C}$ ) y ocurre una fermentación más activa de los carbohidratos disponibles para producir ácido láctico, que es el responsable de la disminución del pH. A temperaturas bajas, el metabolismo celular se ralentiza drásticamente.

La literatura científica informa varios estudios de estabilidad de bacterias probióticas con tiempos inferiores al presente estudio. Betancur *et al.* (2020), evaluaron la viabilidad de una cepa de *Lactobacillus plantarum* CAM-6 en condiciones de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante 48 días. El microorganismo se mantuvo estable solo 24 días, sin embargo, la población bacteriana presente a los 48 días ( $>10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) era suficiente para ejercer actividad probiótica.

Vera *et al.* (2021) estudiaron la estabilidad en anaquel de un probiótico formulado con *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a una temperatura de  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  durante 60 días. Utilizaron dos concentraciones  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$  y en ambos casos observaron una disminución del recuento de viables a partir de los 35 días de almacenamiento.

Recientes investigaciones desarrolladas por Sosa-Cossio *et al.* (2024), estudiaron la estabilidad de la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31 durante 180 días en dos temperaturas. Los resultados demostraron que el cultivo mantuvo estabilidad en su viabilidad durante 14 días a temperatura ambiente, para luego disminuir la concentración celular de 7,64 a 7,02 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, se mantuvo el 91% de su viabilidad hasta los 30 días. En esta variante, el pH del biopreparado disminuyó de 5 a 4,4. En condiciones de refrigeración, LB-31 se comportó estable hasta los 60 días con una concentración de 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, que más tarde disminuyó a 6 Log UFC.mL<sup>-1</sup> con una viabilidad de 78% y un pH superior a 4,5 al finalizar el estudio.

Bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura empleadas en el presente ensayo, dos Santos *et al.* (2019) determinaron la estabilidad de *Lactobacillus casei*, cultivado en jugo de cocoa e informaron que la concentración microbiana disminuía de 8 a 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup>.

La estabilidad en el tiempo observada para el biopreparado probiótico con *Lactobacillus* L31 (90 días), garantiza que la población de lactobacilos viables se mantenga dentro del rango efectivo durante su vida útil y que estos microorganismos sean capaces de producir las sustancias antimicrobianas necesarias para beneficiar la salud de las abejas. Estos estudios son un factor clave para generar confianza en su aplicación por los apicultores, quienes necesitan tener la seguridad de que, el producto que aplican es eficaz.

### **Conclusiones parciales**

1. Se demostró que el nuevo medio de cultivo (MCL31) que se diseñó y optimizó con componentes de origen nacional, constituye un medio adecuado para el crecimiento de la cepa *Lactobacillus* L31, ya que las bacterias manifiestan velocidades de crecimiento similares a las que se obtienen cuando se utiliza el medio MRS o medio de referencia.

2. Se comprobó que el biopreparado obtenido, presenta estabilidad en la viabilidad microbiana hasta los 90 días, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración y hasta los 180 días la población microbiana se mantuvo viable por encima de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

## *Capítulo 5*

## **CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE APLICACIÓN DEL BIOPREPARADO DE *Lactobacillus* L31 EN ABEJAS ADULTAS (*Apis mellifera* L.) A ESCALA DE LABORATORIO.**

### **Introducción**

La seguridad de aplicación de los probióticos es un aspecto primordial para garantizar la salud de las abejas. Estudios recientes abordan la evaluación de la supervivencia de estos insectos cuando se aplican cepas de *Lactobacillus* candidatas a probióticos en el alimento. Investigaciones innovadoras reconocen la ausencia de efectos adversos sobre la salud de las larvas y abejas adultas tras la suplementación de este género microbiano (Urcan *et al.*, 2024a).

La creciente preocupación por los problemas de seguridad asociados con las células microbianas vivas aumenta el interés en el uso de componentes celulares y metabolitos derivados de cepas probióticas. De ahí que el objetivo del presente capítulo fue:

- ✓ Evaluar la seguridad de aplicación del biopreparado *Lactobacillus* L31 en abejas adultas (*A. mellifera*).

### **Materiales y métodos específicos**

#### **5.1 Elaboración del biopreparado. Cepa y condiciones de cultivo**

La cepa *Lactobacillus* L31 se cultivó en caldo MRS por 18 h a 37°C (incubadora, Boxun) en condiciones estáticas y posteriormente, se realizó la inoculación del medio MCL31 (tabla 9) con 111,7 mL.L<sup>-1</sup> del cultivo iniciador (concentración de 10<sup>12</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>). Pasadas las 24 h de incubación a 37°C en condiciones estáticas, el biopreparado obtenido se conservó a 4°C hasta su utilización. Para determinar su calidad se realizaron los conteos de viables a través del método de las diluciones seriadas (ver epígrafe 2.3.2).

## 5.2 Preparación del jarabe

El jarabe (hidromiel) que se utilizó como alimentación artificial se formuló en una proporción de 1:1 v/v (miel/agua destilada estéril). A partir de su preparación se realizó el conteo de BAL a través del método descrito anteriormente (epígrafe 2.3.2).

El alimento se dispuso en frascos plásticos (100 mL) invertidos (figura 13) con las tapas horadadas, por cuyos orificios salía el alimento para el consumo de las abejas. Durante los 10 días que duró el ensayo, el jarabe se preparó diariamente para cada uno de los tratamientos y se reemplazó por uno nuevo de características similares. El consumo del alimento por las abejas fue *ad libitum*.



Figura 13. Cajas con panales de abejas utilizadas para la aplicación de los diferentes tratamientos.

## 5.3 Condiciones experimentales y tratamientos

El experimento se desarrolló durante 10 días, del 16 – 26 de mayo de 2024. Las abejas utilizadas en el experimento procedían del Centro de Crías de Abejas Reinas, epizootiológicamente evaluado como saludable (cuadrante 39-119-90), perteneciente a la UEB Apícola Matanzas, ubicada en el municipio de Jovellanos. Las abejas y sus reinas se seleccionaron de 12 núcleos de fecundación con iguales

condiciones de tenencia y fortaleza, para mantener la mayor homogeneidad en la población.

De cada cuadro se tomaron las abejas a los dos días de emerger y se alojaron en cajas de madera y cristal diseñadas por especialistas de la propia empresa. Estas cajas se conformaron con las siguientes dimensiones: 41 cm de largo, 9 cm de ancho y 29 cm de altura. En la parte inferior se situó un sistema de dos bandejas para la introducción de las abejas y el retiro de las abejas muertas, sin permitir la salida de las mismas. En cada caja se introdujo un panal de crías (de uno a dos días de edad) con su reina, para lograr similitud con las condiciones de vida en la colonia.

Una vez colocadas las abejas dentro de las cajas, se transportaron hasta el Laboratorio de Microbiología perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas (UM) según las condiciones que se describen en el epígrafe 2.5. Al llegar al laboratorio se dejaron reposar 24 horas y se enumeraron las cajas de manera consecutiva para su posterior identificación durante el ensayo *in vivo*. Posteriormente, las abejas se inmovilizaron a baja temperatura (4°C) durante 10 min, para ajustar la población a razón de 100 individuos por caja (figura 13). Las cajas se mantuvieron estáticas en meseta, en un área oscura, protegidas de la luz directa, a temperatura ambiente (25-30°C, entre 50-60% de humedad relativa).

#### **5.4 Tratamientos y diseño experimental**

El experimento se desarrolló con un diseño completamente aleatorizado con tres cajas por tratamiento. Se emplearon 4 tratamientos: 1) Control: solo consumo de hidromiel; 2) hidromiel + biopreparado *Lactobacillus* L31; 3) hidromiel + células de *Lactobacillus* L31 y 4) hidromiel + sustancias postbióticas producidas por *Lactobacillus* L31.

Para los tratamientos 3 y 4 se elaboró 1 L del biopreparado, el cual se centrifugó (centrífuga T23Janetzki) a 5000 rpm durante cinco minutos, para obtener las células de *Lactobacillus* L31 y las sustancias postbióticas (sobrenadante)

producidas. Las células de *Lactobacillus* L31 se lavaron dos veces con buffer salino fosfatado estéril (PBS) y luego se suspendieron en este mismo buffer, ajustándose a la escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). El biopreparado, las células de *Lactobacillus* L31 y las sustancias postbióticas se adicionaron en la hidromiel en una proporción de 1:50 (v/v).

### 5.5 Indicadores analizados

**Tasa de supervivencia (TS):** Se determinó al final del experimento a partir de la fórmula:  $TS = total\ de\ abejas\ vivas / total\ de\ abejas * 100$

**Mortalidad (M):** Esta variable se monitoreó diariamente durante los días que duró el experimento. Al final del ensayo, a partir del conteo de las abejas muertas se determinó la mortalidad del período estudiado a través de la fórmula:  $M = número\ de\ muertes / total\ de\ abejas * 100$ .

**Consumo de jarabe:** El consumo de alimento se observó cada 24 h. La cantidad de jarabe añadido durante los diez días del experimento se anotó y se le restó el volumen de jarabe no consumido diariamente por cada caja. El consumo total se dividió entre los 10 días que duró el experimento para expresar el consumo diario (mL.d<sup>-1</sup>).

**Conteo de BAL presentes en el TGI de abejas.** Se tomaron muestras del TGI de cinco abejas por tratamiento los días 1, 3, 6 y 10. A partir de la apertura de la cavidad abdominal se removió el intestino con una pinza estéril. Para preparar las muestras se tomó el tracto digestivo, y el contenido intestinal se homogenizó en 9 mL de suero fisiológico (0,85% de NaCl). Se realizaron diluciones seriadas y la siembra en placas con agar MRS, las que se incubaron a 37°C por 48 horas.

**Sintomatología de enfermedad / signos de enfermedad:** Se chequeó diariamente mediante el método de la observación visual del insecto, así como la deposición de las heces durante su movimiento por el fondo y el derramamiento de estas en el cristal frontal de las cajas. Se dejó constancia de la sintomatología observada en cada grupo de abejas, y se resaltó los que mostraron dificultad

locomotora, alas dobladas y distensión del abdomen por el acumulo de heces en ellos.

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

### 5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de la supervivencia, la mortalidad, el consumo del jarabe y el conteo de BAL presentes en el tracto digestivo de las abejas se realizó según el epígrafe 2.6. En los casos necesarios se aplicó un ANOVA simple para comprobar diferencias entre los tratamientos.

### Resultados y discusión

El probiótico suministrado, en ninguna de sus variantes, mostró signos de intoxicación en las abejas. Durante el ensayo *in vivo*, no se observaron síntomas de enfermedad y el estado sanitario fue favorable para los cuatro tratamientos. Sin embargo, se observó que, con la aplicación del aditivo microbiano, se redujo la cantidad de abejas muertas en el período evaluado. La tabla 11 muestra los resultados de la mortalidad observada en las abejas durante los diez días. Se aprecian diferencias ( $P < 0,01$ ) entre los tratamientos. Se observó que el grupo control (T1) y el T4 (sustancias postbióticas) mostraron la mayor tasa de mortalidad. Resultados similares observaron Pachla *et al.* (2021), quienes refirieron que la suplementación de la dieta de sacarosa de *A. mellifera* con bacterias ácido lácticas fructofílicas (FLAB) disminuyó la mortalidad y mejoró significativamente la longevidad de las abejas melíferas criadas en jaulas.

Tabla 11. Comportamiento de la mortalidad en los diferentes tratamientos durante el ensayo *in vivo*.

Tratamientos	Mortalidad (%)	EE	P
T1 Control	26,54 <sup>a</sup>	0,22	
T2 Biopreparado	23,52 <sup>b</sup>	0,21	
T3 Células de <i>Lactobacillus</i> L31	24,55 <sup>b</sup>	0,45	0,01
T4 Sustancias postbióticas producidas por <i>Lactobacillus</i> L31	27,08 <sup>a</sup>	0,36	

<sup>a, b</sup> Medias con letras diferentes difieren para  $p < 0,01$  (Tukey HSD).

Los resultados del ensayo *in vivo* realizado en la presente investigación, muestran que el suministro de la cepa candidata a probiótico *Lactobacillus* L31 favoreció la vitalidad de las abejas que lo consumieron. En la tabla 12, se expone la tasa de supervivencia por tratamientos durante los diez días de evaluación del efecto de los grupos experimentales en las abejas. Los tratamientos T2 y T3 resultaron los de mayor tasa de supervivencia y estos difieren ( $P < 0,01$ ) de los tratamientos T1 y T4 donde se observó mayor número de muertes. En todos los grupos experimentales se mantuvo la fortaleza y vitalidad de la colonia, incluso posterior al período experimental.

Estos resultados pudieran asociarse a las bondades que les confiere la cepa probiótica ingerida en la hidromiel. Se conoce que los lactobacilos desarrollan diferentes mecanismos que favorecen su resistencia a las condiciones adversas del ecosistema gastrointestinal, además de que poseen la capacidad de adherirse a la mucosa, lo que le permite excluir a microorganismos patógenos y estimular el sistema inmune (Brar *et al.*, 2025). Por estas razones, son diversas las investigaciones que se realizan con el propósito de evaluar su efecto en la salud de los animales.

Tabla 12. Comportamiento de la tasa de supervivencia en los diferentes tratamientos durante el ensayo *in vivo*.

Tratamientos	Tasa de supervivencia (%)	EE	P
T1 Control	73,46 <sup>b</sup>	0,26	
T2 Biopreparado	76,48 <sup>a</sup>	0,32	
T3 Células de <i>Lactobacillus</i> L31	75,45 <sup>a</sup>	0,41	0,01
T4 Sustancias postbióticas producidas por <i>Lactobacillus</i> L31	72,92 <sup>b</sup>	0,33	

Medias con letras diferentes difieren para  $p < 0,01$  según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

En este sentido, Truong *et al.* (2023) aislaron diferentes cepas de lactobacilos de abejas sanas y seleccionaron (*L. apis* HSY8\_B25, *L. panisapium* PKH2\_L3 y *L. melliventris* HSY3\_B5) aquellas que cumplían con los requisitos para ser candidatos a probióticos según los resultados obtenidos en la seguridad de su aplicación en larvas, actividad inhibitoria contra *P. larvae* en larvas infectadas y alta capacidad de adhesión. Estos autores demostraron que estas cepas de lactobacilos, aisladas de abejas adultas, crías y panales, colonizaron el microbioma intestinal, por lo cual, pueden usarse como cepas probióticas seguras, ya que ejercen efectos beneficiosos para la salud y la vitalidad de estos insectos.

Estos resultados pudieran asociarse con el suministro del alimento artificial, donde en los tratamientos T1 y T4 la dieta se basó en hidromiel (T1) además de las sustancias postbióticas (T4). En estos casos, la población de lactobacilos que recibieron las abejas fue inferior ( $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>) a la suministrada en los tratamientos T2 y T3, donde además de la hidromiel, el biopreparado (T2) y las células de L31 (T3) aportan bacterias viables ( $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>) del microorganismo en estudio.

El incremento de la supervivencia en las abejas donde se aplicaron células vivas puede estar dado por las funciones que desarrollan los lactobacilos en este ecosistema. Se conoce que favorecen la nutrición, la integridad de la mucosa, el estado inmune y el desarrollo fisiológico en general.

Diferentes autores refieren que el aumento de la microbiota beneficiosa, fundamentalmente lactobacilos, es esencial para la digestión y la nutrición de las abejas, ya que son capaces de descomponer carbohidratos complejos y proteínas presentes en la dieta. También se informó que algunas especies contribuyen a la producción de vitaminas como la biotina y la riboflavina, indispensables en el crecimiento y desarrollo de estos insectos. Se reportó además la síntesis de sideróforos como la enterobactina, que puede unirse y transportar al hierro, elemento esencial para la nutrición de las abejas (Alberoni *et al.*, 2016; Cuesta-Maté *et al.*, 2021; Todorov *et al.*, 2024)

Diferentes autores investigaron la seguridad de aplicación de probióticos a través del uso de otros métodos. Tal es el caso de Zulkhairi Amin *et al.* (2023), quienes evaluaron la toxicidad aguda y subaguda de *Bacillus amyloliquefaciens* HTI-19 (aislada de la miel de abejas sin aguijón) en ratas. En este estudio los roedores recibieron una dosis baja ( $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>), media ( $3 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>), o alta ( $1 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>) del biopreparado el cual se suministró diariamente por jeringa durante 14 días. Durante el estudio no se observó mortalidad ni anomalías significativas en ratas durante todo el período experimental. Sin embargo, en la semana 2 del estudio agudo, el peso corporal de las ratas mostró un aumento significativo ( $p = 0,05$ ) en comparación con el control. En general, estos datos indicaron que la administración oral de *B. amyloliquefaciens* HTI-19 hasta  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> durante 28 días puede considerarse seguro.

Diferentes autores consideran que, a pesar de las propiedades medicinales o preventivas de los probióticos, el uso generalizado de bacterias probióticas no se ha controlado en términos de seguridad y toxicidad en diferentes dosis o vías de administración. Se sabe que los probióticos beneficiosos no presentan infectividad,

patogenicidad, efectos secundarios ni propiedades toxicológicas (Gayathri & Krubha, 2021). Sin embargo, la aplicación de bacterias en la alimentación de las abejas debe valorarse adecuadamente debido a la sensibilidad de estos insectos ante factores estresantes que provocan disbiosis en el sistema digestivo.

Por otra parte, estos resultados se encuentran en correspondencia con los conteos de viables realizados en la hidromiel ( $2,8 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>) y al biopreparado probiótico ( $3,2 \times 10^{12}$  UFC.mL<sup>-1</sup>). A la vez, se asocian a los conteos de BAL realizados a partir del contenido intestinal de las abejas de cada tratamiento. El suministro del aditivo microbiano favoreció la presencia de estas bacterias en el TGI de las abejas evaluadas. En la figura 14, se muestra como las abejas que recibieron el biopreparado y las células del *Lactobacillus* L31 (T2 y T3) en la hidromiel a las 72 horas manifestaron mayor población de estas bacterias en su contenido intestinal en comparación con las abejas de los tratamientos T1 y T4. Sin embargo, en los dos últimos muestreos los conteos de estas bacterias en los tratamientos T2, T3 y T4 superaron al T1 (control).

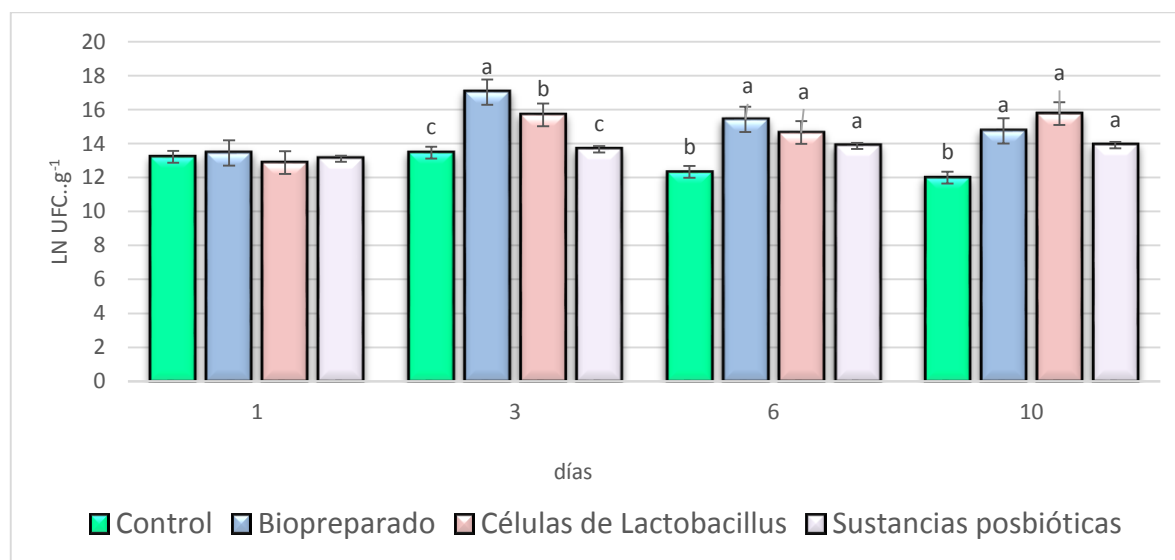


Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos en los conteos de BAL del tracto digestivo de abejas adultas. 1 día EE:0,94; 3 días EE:0,25; 6 días EE: 0,033 y 10 días EE: 0,29. Medias con letras diferentes difieren para  $p < 0,01$  según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD.

Kaznowski *et al.* (2005) utilizaron dos probióticos, Biogen-N y Trilac, como suplementos para sustituir el polen en la alimentación de las abejas melíferas. Los probióticos se administraron durante todo el experimento por 14 días o solo durante 2 días. Estos autores observaron que el intestino medio de las abejas obreras fue colonizado por bacterias presentes en los probióticos, entre ellas *Lactobacillus* spp., *Pediococcus acidilactici*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium*. También refirieron que se producía una mejor supervivencia de las abejas y una mayor masa seca y nivel de grasa cruda en comparación con las abejas alimentadas solo con el sustituto de polen.

Truong *et al.* (2023) estudiaron la comunidad microbiana de las abejas y demostraron que los lactobacilos aislados de ellas tienen potencial para utilizarse como cepas probióticas. La presencia de estos microorganismos en el TGI incrementa el estado de eubiosis y proliferan las bacterias nativas o beneficiosas, lo cual mejora la fisiología y salud de estos insectos.

Se evidencia que, a medida que las sustancias postbióticas se incluían en el alimento, con el tiempo, modificaron el ecosistema intestinal que propició el incremento de las bacterias ácido lácticas. Estos resultados coinciden con los reportados por García-Vicente *et al.* (2025), quienes suministraron sustancias postbióticas producidas por BAL con un suplemento líquido de proteínas comerciales (Promobee®) y obtuvieron *in vivo* una alta supervivencia de las crías en las colmenas y mayor producción de miel.

Los postbióticos son preparaciones de microorganismos inanimados y/o sus componentes que confieren beneficios para la salud del huésped. El término «inanimado» se refiere a la eliminación de los microorganismos vivos, sin que esto implique la pérdida de función, al preservar los metabolitos y las estructuras bacterianas (García-Vicente *et al.*, 2024; Bueno *et al.*, 2025).

Teame *et al.* (2020) definieron a los componentes estructurales celulares y los metabolitos de las bacterias probióticas como paraprobóticos y postbióticos, respectivamente. Los paraprobóticos y postbióticos producidos a partir de lactobacilos consisten en una amplia gama de moléculas que incluyen a peptidoglicanos, proteínas de superficie, polisacáridos de la pared celular, proteínas secretadas, bacteriocinas y ácidos orgánicos, que median los efectos positivos en el huésped, como efectos inmunomoduladores, antitumorales y antimicrobianos.

La presencia de células vivas en los tratamientos T2 y T3 favoreció el incremento de las BAL en el intestino de las abejas. Con su inclusión en el alimento, puede que colonizaran este ecosistema y activaran diferentes mecanismos que favorecen la fisiología del TGI. Otros estudios confirmaron que los componentes de la superficie celular de los lactobacilos se consideran una parte importante de las moléculas efectoras, ya que esta parte de la célula microbiana es la primera en interactuar con las células huésped. Los componentes de la envoltura celular de los lactobacilos, clasificados como paraprobóticos, incluyen peptidoglicano, ácido teicoico, polisacáridos de la pared celular, proteínas asociadas a la superficie celular y filamentos proteicos, que median los efectos beneficiosos para el huésped (Castro-Bravo *et al.*, 2018).

Estos resultados coinciden con los estudios de Besharati *et al.* (2024), quienes aplicaron el probiótico multicepa Lactofid® (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium* con  $5,2 \times 10^{12}$  UFC.g<sup>-1</sup>) en dosis de 2 y 3 g.L<sup>-1</sup> de jarabe y un antibiótico (tetraciclina). Estos autores refieren que en los tratamientos con el probiótico aumentó la población de lactobacilos (4,48 log UFC.g<sup>-1</sup>) ( $p < 0,05$ ) en relación a control (1,84 Log UFC.g<sup>-1</sup>). También observaron diferencias con el uso del antibiótico, quien provocó la reducción de la población de las BAL hasta 0,48 Log UFC.g<sup>-1</sup>.

El incremento de la población de *Lactobacillus* spp. también se observó por Sinekçi, *et al.* (2024), cuando investigaron los efectos de un probiótico comercial que contenía diferentes especies de *Lactobacillus* y extractos de especias, para lo cual

realizaron recuentos QPCR de *Lactobacillus* spp. y del genophylum Firmicutes en mezclas intestinales de 12 grupos de abejas diferentes con y sin suplementos probióticos. Observaron que existían diferencias, al aumentarse en 5,5 veces los niveles de estas BAL en el grupo tratado con estos aditivos.

De acuerdo con Zheng *et al.* (2017), cuando se incrementa la microbiota intestinal beneficiosa de la abeja se promueve el metabolismo bacteriano. Las bacterias intestinales también influyen en las condiciones fisicoquímicas del intestino, al reducir el pH y los niveles de oxígeno. Las bacterias residentes periféricas consumen oxígeno y mantienen así la anoxia, necesaria para la actividad microbiana. Además, muchas bacterias producen ácidos grasos de cadena corta, como acetato, butirato y propionato, entre sus principales metabolitos. De modo que si se incrementa la presencia de *Lactobacillus* spp. en este ecosistema, pudiera tener efectos beneficiosos en los procesos fermentativos que aquí se desarrollan.

Algunos autores consideran que una manera de mantener la salud de las abejas melíferas y preservar la eubiosis del tracto digestivo es precisamente el aporte de aditivos, como probióticos y ácido láctico en su nutrición. Esto reduce el pH intestinal, lo cual desfavorece el crecimiento de bacterias patógenas que causan graves riesgos para las abejas, como la Loque europea y la Loque americana (Al-Wahab *et al.*, 2023).

En correspondencia con los resultados anteriores se observó que el consumo de alimento también difirió ( $p < 0,01$ ) entre los grupos experimentales. En la tabla 13 se muestra el consumo del alimento artificial por tratamientos. Los grupos experimentales T2 y T3 fueron los que mayor consumo realizaron durante el ensayo, seguidos por los T1 y T4. Se conoce que los microorganismos probióticos compiten con los microbios potencialmente patógenos en el tracto gastrointestinal. Esta competencia implica la adhesión al epitelio intestinal, lo que conduce a una mayor disponibilidad y utilización de nutrientes.

Tabla 13. Efecto de los diferentes tratamientos en el consumo de jarabe durante el ensayo *in vivo*.

Tratamientos	Consumo de alimento (mL.d <sup>-1</sup> )	EE	P
T1 Control	10,72 <sup>b</sup>	0,34	
T2 Biopreparado	18,16 <sup>a</sup>	0,33	
T3 Células de <i>Lactobacillus</i> L31	16,52 <sup>a</sup>	0,27	0,01
T4 Sustancias postbióticas producidas por <i>Lactobacillus</i> L31	8,85 <sup>b</sup>	0,57	

<sup>a, b</sup> Medias con letras diferentes difieren para  $p < 0,01$  (Tukey HSD).

Andrearczykel *et al.* (2014) desarrollaron un primer experimento con el objetivo de determinar el efecto de un suplemento probiótico en la dieta de las abejas sobre la mortalidad y la ingestión de alimento de las abejas melíferas, cuando se desarrollaba la infestación por *Nosema* spp. La adición del probiótico provocó un aumento de la infección fúngica en las abejas melíferas de verano e invierno; sin embargo, el sirope suplementado con probióticos se consumió por las abejas más rápidamente. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Szymaś *et al.* (2007), quienes observaron que las abejas experimentales bebieron con mayor facilidad los jarabes con ácido láctico y la preparación probiótica, que el jarabe de azúcar puro.

### Conclusiones parciales

1. El biopreparado de *Lactobacillus* L31 constituye un aditivo seguro para su aplicación en las abejas.
2. La adición del biopreparado con potencial probiótico en el alimento contribuyó al aumento de la supervivencia de las abejas adultas, incrementó la población de BAL en el intestino de estos insectos y estimuló el consumo de jarabe.

## *Capítulo 6*

## CAPÍTULO 6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Lactobacillus* L31 FRENTE A *P. larvae* A ESCALA DE LABORATORIO.

### Introducción

La evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de las bacterias con potencial probiótico es esencial para su selección. De ahí que diferentes investigadores utilizan técnicas o ensayos que permiten determinar el comportamiento de las cepas frente a microorganismos patógenos. Los ensayos de autoagregación, coagregación y los co-cultivos constituyen pasos indispensables para predecir el efecto antibacteriano *in vivo* (Pachla *et al.*, 2021).

Por su parte, la evaluación *in vivo* de la actividad probiótica del género *Lactobacillus* en larvas infectadas con *P. larvae* constituye un aspecto fundamental para validar el potencial de estas bacterias como agentes de control biológico de la LA. Estos estudios, permiten determinar si la administración de estas bacterias puede reducir la mortalidad larval, disminuir la carga bacteriana de *P. larvae* en las larvas infectadas, mejorar el desarrollo y la salud general de las larvas y/o modular la respuesta inmune frente a la infección. Los resultados obtenidos en estos ensayos *in vivo* son cruciales para seleccionar las cepas más efectivas en el control de la enfermedad y permitirá desarrollar estrategias de aplicación prácticas y seguras para su uso en la apicultura (Daisley *et al.*, 2020b; Iorizzo *et al.*, 2020). Por ello, el presente capítulo tuvo como objetivos:

- ✓ Determinar *in vitro* la actividad antibacteriana de *Lactobacillus* L31 frente a *P. larvae*.
- ✓ Evaluar el efecto antimicrobiano de *Lactobacillus* L31 en larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae*.

## **Materiales y Métodos específicos**

### **6.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactobacillus* L31 frente a *Paenibacillus larvae*.**

Para la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de *Lactobacillus* L31 se desarrollaron los siguientes ensayos:

#### **6.1.1 Método "Agar Spot"**

Para la realización de esta técnica, se utilizó como referencia la metodología descrita por Hernández *et al.* (2019). Como cepa indicadora se empleó a *P. larvae*, la cual se cultivó en 50 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C durante 18 h. A partir de este cultivo, se prepararon suspensiones de este microorganismo en solución salina con una turbidez equivalente a la escala 0,5 de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>).

Como cepa productora se utilizó *Lactobacillus* L31, la cual se multiplicó en caldo MRS por 18-24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se sembraron en placas con agar MRS en tres puntos o spots con 10 µL del cultivo en cada uno. Luego se incubó a 37°C por 24 h en condiciones de anaerobiosis (atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%).

A las 24 h, las placas inoculadas con *Lactobacillus* L31 se recubrieron con 10 mL de agar BHI semisólido (caldo BHI suplementado con agar bacteriológico al 0,7%, atemperado a 40°C y al 1% con la suspensión celular del microorganismo indicador). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h en condiciones de aerobiosis. La medición de los halos se realizó con un pie de rey y se consideró que existía inhibición cuando estos fueron superiores a 10 mm.

#### **6.1.2 Ensayo de auto-agregación**

En este ensayo, se desarrolló un diseño completamente aleatorizado y tres tratamientos (tres momentos de muestreo: 2, 3 y 4 h). Para determinar la auto-agregación de la cepa *Lactobacillus* L31 se utilizó la metodología descrita por Pachla *et al.* (2021) con algunas modificaciones. La cepa *Lactobacillus* L31 se

cultivó en caldo MRS a 37°C durante 24 h. El cultivo de células se recolectó por centrifugación (3500 rpm, 15 min), se lavaron dos veces con solución PBS (pH 7,4) y se suspendieron en 4 mL del mismo tampón. Luego, se ajustaron a una  $DO_{560} = 1,0$  ( $A_0$ ) mediante la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS (ULTROSPEC, 2000). Un volumen de 4 mL de esta suspensión bacteriana se agitó en un vórtex durante 10 s y se incubó a temperatura ambiente durante 4 h. La absorbancia ( $A_t$ ) se midió a 560 nm a las 2, 3, 4 h desde el inicio del experimento. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

El porcentaje de autoagregación (Auto-A%) se expresó como se indica en la siguiente fórmula:

$$Auto - A\% = (1 - A_t / A_0) \times 100 .$$

Donde  $A_0$  es la densidad óptica inicial de la suspensión bacteriana y  $A_t$  representa la absorbancia de la suspensión bacteriana después de 2, 3 y 4 h desde la densidad óptica inicial. Los datos de los experimentos independientes, cada uno con tres réplicas, se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar.

### 6.1.3 Ensayo de co-agregación

Se empleó un diseño completamente aleatorizado y tres tratamientos (momentos de muestreo: 2, 3 y 4 h). La co-agregación de las células de *Lactobacillus* L31 a *P. larvae* se determinó a partir de la técnica expuesta por Pachla *et al.* (2021). La suspensión de *P. larvae* se preparó a partir del crecimiento de este microorganismo en caldo BHI y *Lactobacillus* L31 en caldo MRS, ambos incubados a 37°C por 24 h. Luego se procedió a mezclar volúmenes iguales (2 mL) de las suspensiones de *Lactobacillus* L31 y la cepa patógena, con la misma densidad óptica ( $DO_{560} = 1,0$ ), se agitaron durante 10 s en un vórtex y se continuó con el mismo protocolo desarrollado para la autoagregación. El porcentaje de co-agregación se calculó mediante la ecuación:

$$Co - A\% = (1 - A_t / A_0) \times 100$$

Donde  $A_0$  es la densidad óptica inicial de la mezcla de las dos suspensiones bacterianas y  $A_t$  representa la absorbancia de la mezcla de dos suspensiones bacterianas después de 2, 3 y 4 h desde la densidad óptica inicial. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar a partir de tres réplicas por tratamiento.

#### 6.1.4 Técnica de cultivos mixtos o co-cultivos

En este estudio, se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos: Grupo 1, control de *Lactobacillus* L31 ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>); Grupo 2, control de *P. larvae* ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>) y Grupo 3, co-cultivo conformado por la mezcla de *Lactobacillus* L31 y *P. larvae* en una proporción 2:1.

Para la obtención del inóculo microbiano, *Lactobacillus* L31 se sembró en caldo MRS durante 18 h a 37°C en condiciones estáticas. Luego, este cultivo se ajustó a una concentración microbiana de  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup>. En el caso de *P. larvae*, se partió de un cultivo en agar nutriente con 24 h de incubación, el cual se sembró en caldo nutriente y se incubó en condiciones de aerobiosis (zaranda orbital HDL Apparatus) a 37°C. Luego se ajustó a una concentración de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

Se utilizó la técnica descrita por Orlowski y Bielecka (2006) como procedimiento experimental, modificada por los autores de esta investigación. El co-cultivo se realizó en el medio RJB1, el cual simula el alimento que llega al contenido gastrointestinal de las larvas de abejas (Daisley *et al.*, 2020b). La composición por litro de este medio es: 50 g de miel de abejas; 0,9 g extracto de levadura; 5,1 g de D-glucosa y 5,1 g de D-fructosa. Este medio se adicionó en frascos de 250 mL, a razón de 100 mL de volumen efectivo, se ajustó en cada uno el pH inicial de la fermentación (6,5) y se procedió a su esterilización (15 min a 1,5 atm). Luego, se añadieron los inóculos microbianos correspondientes a cada tratamiento (2 mL del cultivo candidato a probiótico y 1 mL del cultivo del microorganismo patógeno en el frasco control correspondiente a cada uno de ellos y la mezcla de estos dos volúmenes en el co-cultivo). Los cultivos se incubaron en condiciones estáticas

durante 24 h a 37°C y se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 24 h para determinar la cinética de crecimiento de cada bacteria en estas condiciones. Se utilizaron tres réplicas para cada tratamiento.

El conteo de los microorganismos para cada muestra se realizó mediante diluciones seriadas (ver epígrafe 2.3.2). Las diluciones se inocularon individualmente (1 mL) en medios selectivos. Para *Lactobacillus* L31, se sembró el cultivo control (1) y el co-cultivo (3) a profundidad en placas con agar Rogosa. El conteo de *P. larvae* se realizó a partir de la siembra del cultivo control (2) y el co-cultivo (3) en la superficie del medio agar nutriente con el empleo de la espátula de Drigalsky. Esta operación se replicó tres veces y las placas se incubaron a 37°C. Posteriormente, el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó bajo lupa, por conteo visual de colonias. Para cada muestra tomada en las diferentes horas se determinó el pH (ver epígrafe 2.4.1), tanto para los co-cultivos como para los cultivos controles.

## **6.2- Actividad antimicrobiana *in vivo* de *Lactobacillus* L31 en larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae*.**

En este estudio, se utilizó un diseño experimental unifactorial categórico completamente aleatorizado con 16 corridas y cuatro réplicas. Para ello se conformaron cuatro grupos experimentales con 50 larvas cada uno. Los tratamientos fueron: T1 control (dieta), T2 (dieta + *Lactobacillus* L31) y T3 (dieta + *Lactobacillus* L31 + *P. larvae*) y T4 (dieta + *P. larvae*). En este último tratamiento, la cepa con características probióticas se suministró 8 h antes de aplicar la suspensión de esporas de *P. larvae* a las larvas.

Para el desarrollo del experimento, se utilizaron larvas sanas de *A. mellifera* de un día de edad procedentes del Centro de crianzas de abejas reinas " El Copal" perteneciente a la Empresa Apícola de Matanzas. Estas larvas se trasladaron al laboratorio bajo condiciones de asepsia, en urnas de madera y cristal. Las larvas se colectaron a partir de un cuadro de cera (Daisley *et al.*, 2020b).

El inóculo de *P. larvae*, se obtuvo a partir de un cultivo de este microorganismo en caldo J (ver epígrafe 2.1.3) con 24 h de incubación a 37°C. Las células vegetativas obtenidas se sembraron en placas con Agar J y se incubaron a 37°C durante 72 h en condiciones de aerobiosis para la obtención de las esporas.

Las esporas desarrolladas en el agar se resuspendieron en buffer salino fosfatado estéril (PBS). Luego se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 min y se descartó el sobrenadante, procedimiento que se realizó 2 veces consecutivas. A las suspensiones de esporas obtenidas, se les realizó una siembra directa en placas con agar J (ver epígrafe 2.1.3) para verificar su viabilidad y también se cuantificaron a través del MRP. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración de  $10^3$  esp.mL<sup>-1</sup>. Luego se conservaron a 4°C.

La cepa *Lactobacillus* L31 se sembró en caldo MRS y se incubó a 37°C durante 48 h. Luego, las células vegetativas obtenidas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Este procedimiento se realizó dos veces consecutivas. A cada suspensión bacteriana, se le realizó una siembra directa en agar MRS para verificar el crecimiento del microorganismo y se cuantificó la cantidad de células por MRP. Las suspensiones obtenidas se ajustaron a una concentración de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> y se conservaron a 4°C.

La composición de la dieta utilizada en la alimentación de las larvas en el laboratorio fue (p/v): 50% de jalea real, 6% de D-glucosa, 6% de D-fructosa, 1% de extracto de levadura y 37% de agua destilada estéril (Al-ghamdi *et al.*, 2018). Este alimento se conservó a 4°C para su posterior utilización.

El traslado de las larvas hacia placas de microtitulación de 96 pocillos, se realizó a tiempo cero bajo condiciones de laboratorio con ayuda de una aguja estéril. Previamente, las placas se incubaron con el alimento durante 30 min a una temperatura de 34,5°C con un alto porcentaje de humedad (96%). Este

procedimiento tuvo como objetivo que las larvas no se afectaran con una temperatura diferente a la de su incubación, lo que pudiera provocar su muerte.

Las larvas se alimentaron el primer día con la dieta artificial más los constituyentes que forman parte de cada grupo experimental. En los restantes días, la dieta artificial se utilizó en todos los casos hasta el final del ensayo. Las cantidades de alimento que se utilizaron por día fueron: primer día 20  $\mu\text{L}$ , segundo día 30  $\mu\text{L}$ , tercer día 40  $\mu\text{L}$ , cuarto día 50  $\mu\text{L}$  y quinto día 60  $\mu\text{L}$ . En los días posteriores, el alimento también se atemperó antes de su administración. La lectura de las placas del ensayo se realizó a las 48, 72, 96 y 120 h. Se extrajeron diariamente las placas de la incubadora y se examinaron para detectar la viabilidad de las larvas. Las larvas muertas se removieron con una aguja estéril, estas se reconocieron por la pérdida de su elasticidad y el cambio de coloración de crema a marrón.

### **6.3 Análisis estadístico**

El análisis de los datos se realizó como se explica en el epígrafe 2.6. Se realizó un análisis de varianza simple para determinar la presencia de diferencias entre los tratamientos.

## **Resultados y discusión**

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactobacillus* L31 frente a *Paenibacillus larvae*.**

#### **Método agar "Spot"**

La actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactobacillus* L31 frente a *P. larvae* a través del método de "Agar Spot" se demostró cuando se observó que, a las 48 h de incubación, el patógeno se inhibió completamente. Sin embargo, en la placa control se observó el crecimiento característico de esta bacteria patógena (figura 15). A diferencia de la técnica descrita anteriormente (epígrafe 3.2.2), donde se utilizan solo las sustancias postbióticas producidas en el caldo MRS para comprobar su

actividad antibacteriana, en este caso, se emplea el cultivo íntegro (células + sustancias postbióticas), razón por la cual el efecto fue superior.

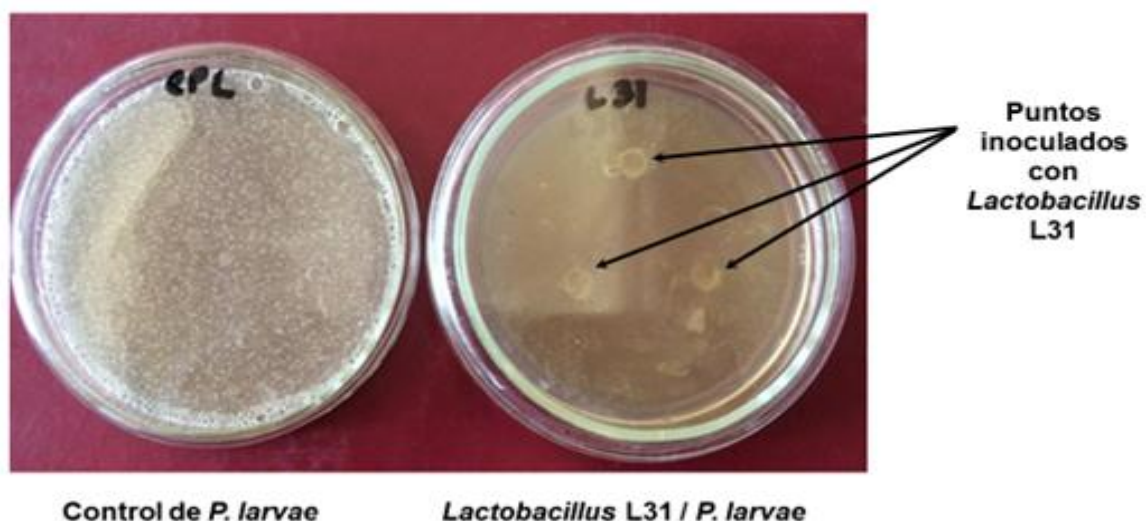


Figura 15. Actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactobacillus* L31 frente a *P. larvae* a través del método de "Agar Spot".

Se conoce que cuando estas bacterias crecen en ausencia de otras especies solamente producen las sustancias o metabolitos propios de su metabolismo en ese ambiente; sin embargo, cuando se enfrentan dos microorganismos diferentes en el mismo medio, se induce la producción de sustancias antimicrobianas, que puede llevar a la muerte o inhibición del crecimiento de la bacteria patógena (Bamisi *et al.*, 2024).

A diferencia de los resultados del presente trabajo, en la literatura consultada se hace referencia a la producción de halos de menor diámetro. Esta técnica se utilizó como prueba preliminar para evaluar 61 cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* contra *P. larvae* ATCC9545 por Iorizzo *et al.* (2020). Solo cinco de ellas mostraron actividad antagonista frente a este patógeno y los valores de los halos estuvieron entre 4,2-7,2 mm.

Rodríguez *et al.* (2021), caracterizaron *in vitro* diferentes bacterias ácido lácticas (*Fructobacillus fructosus* SS66, *Lactococcus garvieae* SS79, *Fructobacillus*

*fructosus* SS72, *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73), aisladas del tracto digestivo de abejas *A. mellifera* con el objetivo de demostrar su potencial probiótico. Dentro de las pruebas realizadas, se evaluó el antagonismo microbiano *in vitro* frente a *P. larvae* además de otros patógenos. A las 72 h, se observaron halos de 14,93 mm para *L. kunkeei* SS70, 5 mm para *F. fructosus* SS72, 12 mm para *L. rhamnosus* SS73 y 4 mm para *L. garvieae* SS79.

La utilización de esta técnica para la cepa *Lactobacillus* L31, indujo la producción de metabolitos que provocaron una fuerte inhibición del patógeno. Para este género, varios autores reportan la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas fundamentalmente. Sin embargo, no siempre se dispone de un completo análisis para determinar la naturaleza de las sustancias antagonicas que se producen.

### **Ensayos de auto-agregación y co-agregación**

Los ensayos de auto-agregación y co-agregación son herramientas clave para identificar y seleccionar cepas probióticas eficaces. En el caso de *Lactobacillus*, estas propiedades no solo son indicadoras de su capacidad para colonizar y persistir en el intestino, sino también de su habilidad para interactuar con otros microorganismos potencialmente patógenos.

En este estudio, los resultados obtenidos para *Lactobacillus* L31 tras 4 h de incubación a temperatura ambiente muestran un porcentaje alto para ambos ensayos (tabla 14). En la auto-agregación, se comprobó que las células de este microorganismo tienen gran capacidad para adherirse entre sí. Se conoce que estas interacciones están mediadas por proteínas de superficie, polímeros extracelulares o componentes de la pared celular. La co-agregación demuestra que esta cepa puede unirse al patógeno en un tiempo relativamente corto. Esta asociación está generalmente mediada por lectinas, adhesinas o receptores específicos en la superficie celular (Daisley *et al.*, 2020a; Truong *et al.*, 2023). Los valores observados superan los reportados en otros estudios previos (Iorizzo *et al.* 2020; Pachla *et al.*, 2021).

Tabla 14. Porcentaje de auto-agregación y co-agregación de *Lactobacillus* L31 en el tiempo.

<b>Cepa <i>Lactobacillus</i> L31</b>		
<b>Tiempo (h)</b>	<b>Auto-agregación (%)</b>	<b>Co-agregación (%)</b>
2	9,22 ± 2,4 <sup>c</sup>	20,31 ± 6,34 <sup>c</sup>
3	15,7 ± 3,43 <sup>b</sup>	37,2 ± 4,89 <sup>b</sup>
4	20,66 ± 3,85 <sup>a</sup>	47,55 ± 4,16 <sup>a</sup>

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $p < 0,01$ ).

### **Técnica de cultivos mixtos o co-cultivos**

En la figura 16, se observan los resultados de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* L31 y *P. larvae* durante el desarrollo del co-cultivo. Los dos microorganismos controles (CL y CP) crecieron sin dificultad en el medio RJB1 hasta las 12 h, mientras que *Lactobacillus* L31 presente en el co-cultivo (CCL) aumentó su crecimiento hasta las 8 h, probablemente debido a la competencia por nutrientes. Sin embargo, a partir de las 8 h se observa una disminución notable de la viabilidad de *P. larvae* en el co-cultivo (CCP) hasta las 24 h. Esto significa que las células de *Lactobacillus* L31 produjeron alguna sustancia que inhibe o elimina a este microorganismo patógeno.

Se tomó la información referida a la variación del pH (tabla 15) y se comprobó que no se produjeron diferencias entre los tratamientos en ninguna de las horas de muestreo. *P. larvae* fue capaz de crecer a pH bajo (4,5), por lo que se descarta la inhibición por la presencia de ácidos orgánicos producidos por *Lactobacillus* L31. Estos resultados indican que la actividad antagonista está dada por la producción de otras sustancias, probablemente bacteriocinas o peróxido de hidrógeno.

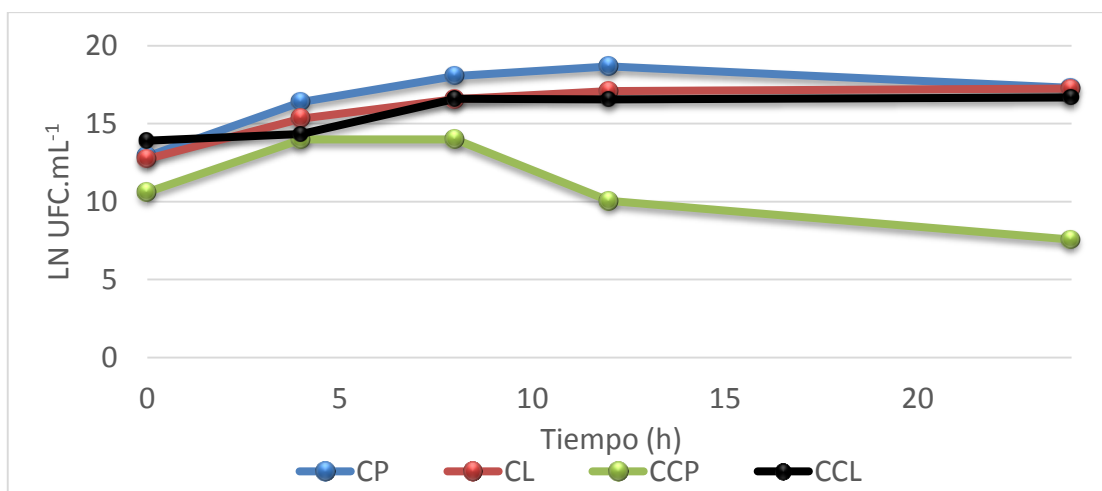


Figura 16. Cinética de crecimiento durante el enfrentamiento de *Lactobacillus* L31 y *P. larvae* en el co-cultivo. CP (control de *P. larvae*), CL (control de *Lactobacillus* L31), CCP (conteo de *P. larvae* en el co-cultivo) y CCL (conteo de *Lactobacillus* L31 en el co-cultivo). Hora 0: P = 0,0532 y  $\pm$ EE = 0,71; Hora 4: P = 0,2607 y  $\pm$ EE = 0,85; Hora 8: P = 0,0159 y  $\pm$ EE = 0,66; Hora 12: P = 0,001 y  $\pm$ EE = 0,15; Hora 24: P = 0,001 y  $\pm$ EE = 0,08.

Varios estudios evaluaron el potencial del género *Lactobacillus* como biocontrolador natural a través de ensayos de co-cultivo *in vitro*, los cuales muestran reducciones del 65–90% en la viabilidad de *P. larvae* cuando se aplican estos aditivos (Arredondo *et al.*, 2018; Honey Chandran & Keerthi, 2018).

Tabla 15. Comportamiento del pH durante el crecimiento de las cepas en el co-cultivo ( $p < 0,01$ ).

Hora	Control <i>Lactobacillus</i> L31	Control <i>P. larvae</i>	Co-cultivo	P
0	6,51 $\pm$ 0,33	6,51 $\pm$ 0,51	6,5 $\pm$ 0,38	0,75
4	4,21 $\pm$ 0,42	4,20 $\pm$ 0,44	4,19 $\pm$ 0,55	0,27
8	4,50 $\pm$ 0,28	4,50 $\pm$ 0,62	4,50 $\pm$ 0,36	1,00
12	4,50 $\pm$ 0,43	4,50 $\pm$ 0,37	4,50 $\pm$ 0,33	0,72
24	4,49 $\pm$ 0,39	4,49 $\pm$ 0,52	4,50 $\pm$ 0,31	0,27

Los datos se muestran como la media  $\pm$  de la desviación estándar

En investigaciones realizadas por Iorizzo *et al.* (2020), utilizaron un medio semisintético para la realización de esta prueba. La cepa elegida fue *L. plantarum*, la cual inhibió el 85% del crecimiento del patógeno. Truong *et al.* (2023) emplearon un medio de cultivo basado en gelatina, aminoácidos y azúcares, diseñado para imitar el alimento larval. En este ambiente, la cepa de *L. johnsonii* provocó un 65% de inhibición a *P. larvae* tras 48 horas. Se detectó la producción de compuestos antimicrobianos termolábiles, posiblemente bacteriocinas.

### **Actividad antimicrobiana *in vivo* de *Lactobacillus* L31 en larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae***

En la tabla 16, se aprecian los resultados de la mortalidad en larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae* tratadas con *Lactobacillus* L31. La menor mortalidad correspondió al T2 (D+L) con un 39,50%, lo que sugiere que la aplicación del microorganismo propició el incremento de la resistencia con respecto a la dieta o T1 (52%). En el T3 (D+L+PL), la mortalidad fue inferior con un valor de 47,5% ( $p < 0,01$ ) con respecto al control positivo T4 (D+PL) que alcanzó 95,5%. Este ensayo reafirma que la aplicación de la bacteria *Lactobacillus* L31 resultó beneficiosa para la salud de las larvas.

Tabla 16. Mortalidad de las larvas en el ensayo de la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vivo* de *Lactobacillus* L31 frente a *P. larvae* a las 120 h.

<b>Tratamientos</b>	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
D	52,00 <sup>b</sup>	1,63
D+L	39,50 <sup>d</sup>	1,26
D+L+PL	47,50 <sup>c</sup>	2,06
D+PL	95,50 <sup>a</sup>	0,96

Leyenda: (D) Dieta, (D+L) Dieta + *Lactobacillus* L31 (D+L+PL) Dieta + *Lactobacillus* L31 + *P. larvae*, (D+PL) Dieta + *P. larvae*. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ( $p < 0,01$ ).

En la figura 17, se representa el comportamiento de la supervivencia de las larvas en los diferentes momentos de muestreo bajo el efecto de los cuatro tratamientos. Se comprobó que a medida que transcurría el tiempo disminuía la supervivencia, y ya a las 48 h se evidenciaron diferencias entre los mismos. Los grupos tratados con *Lactobacillus* L31 (T2 y T3) presentaron una supervivencia superior ( $p < 0,01$ ) a partir de las 72 h, aunque T2 marcó diferencias desde las 48 h. Es probable que las células de *Lactobacillus* L31 durante este tiempo produjeran sustancias que inhiben la germinación de las endosporas de *P. larvae* aplicadas a las larvas y por otra parte redujeran el estrés provocado por las condiciones experimentales.

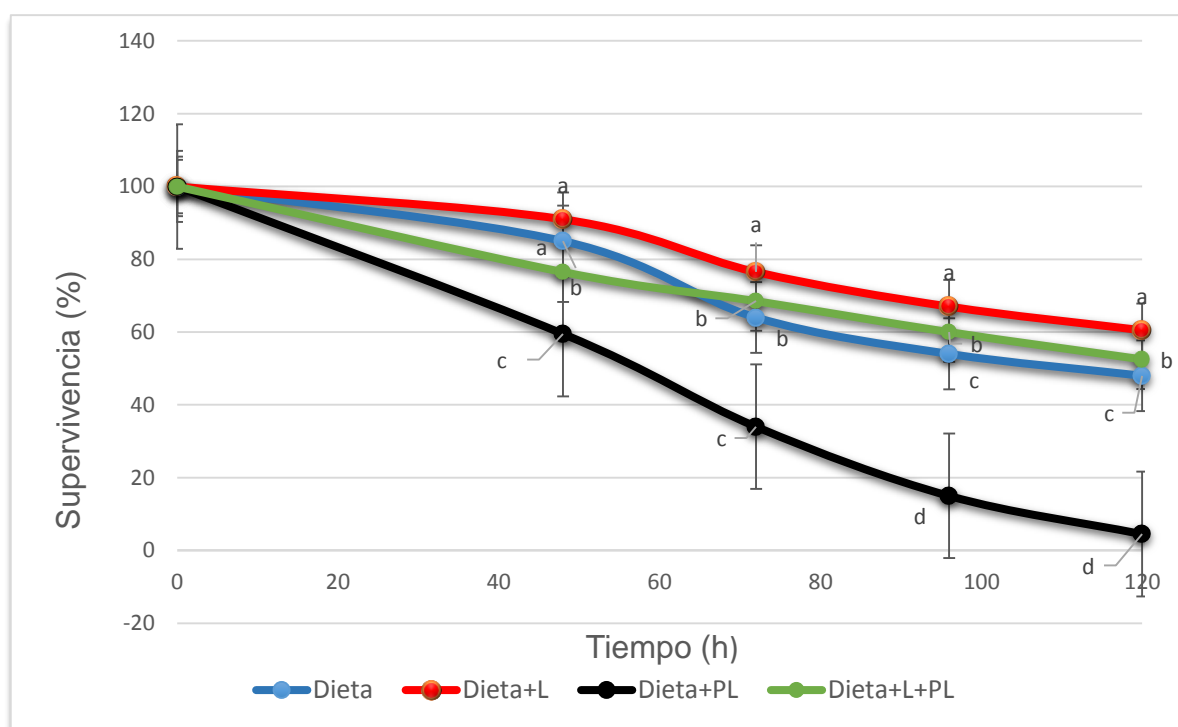


Figura 17. Comportamiento del porcentaje de supervivencia de larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae* tratadas con *Lactobacillus* L31 durante el experimento. Leyenda: (D) Dieta, (D+L) Dieta + *Lactobacillus* L31 (D+L+PL) Dieta + *Lactobacillus* L31 + *P. larvae*, (D+PL) Dieta + *P. larvae*. Las barras representan la desviación estándar.

Estudios similares reportados por varios investigadores muestran variabilidad en cuanto al porcentaje de supervivencia de las larvas. Al-Ghamdi *et al.* (2018), evaluaron los efectos de *Fructobacillus fructosus* (T1), *Proteus mirabilis* (T2), *Bacillus licheniformis* (T3), *Lactobacillus kunkeei* (T4), *Bacillus subtilis* (T5), *Enterobacter kobei* (T6) y *Morganella morganii* (T7) en la resistencia de larvas de abejas melíferas infectadas con *P. larvae* y de esta forma determinar su función probiótica. Se observaron diferencias en el porcentaje de supervivencia de los grupos tratados. Los datos obtenidos oscilaron entre 13,33 y 43,33%. El control positivo (larvas de abejas alimentadas con dieta normal que contenía esporas de *P. larvae*) presentó el menor valor (13,33%), mientras que las larvas alimentadas solo con la dieta (control negativo) mostraron los mejores resultados (73,33 %). De los siete tratamientos con bacterias intestinales, T4 y T3 revelaron los mejores resultados 43,33% y 33,33% respectivamente. La actividad probiótica detectada en este estudio para la cepa de *L. kunkeei*, fue inferior con respecto a la reportada en el presente ensayo.

Daisley *et al.* (2020b) evaluaron un consorcio comercial de lactobacilos llamado BioPatty compuesto por *L. plantarum* Lp39, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. kunkeei* BR-1 tanto en colmenas como en larvas infectadas a nivel de laboratorio con *P. larvae*. Los resultados obtenidos expresan una reducción de la infección en ambos casos, además de regular positivamente la expresión de genes relacionados con la inmunidad.

Se conoce que las bacterias ácido lácticas pueden interferir en el proceso de germinación de las esporas. Algunos investigadores refieren que ciertas especies de *Lactobacillus* son capaces de producir enzimas que degradan compuestos químicos como el ácido úrico y la L-tirosina, los cuales constituyen señales claves para el inicio de la germinación de las esporas de *P. larvae* en el lumen intestinal de las larvas. Entre ellas están la uricasa, la alantoinasa y la alantoicasa, que pueden degradar el ácido úrico en urea y la tirosina descarboxilasa que degrada la tirosina en tiramina (Alvarado *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2016).

El proceso infeccioso de esta enfermedad se inicia con la ingestión del alimento contaminado con esporas de *P. larvae* por parte de las larvas jóvenes durante los primeros días de vida. Una vez en el intestino larval, las esporas germinan después de un período variable que fluctúa entre las 24 y 48 h. Posteriormente, se originan las formas vegetativas, las cuales proliferan rápidamente y secretan enzimas líticas que degradan los tejidos de la larva y ocasionan la muerte de esta por septicemia generalizada. Este proceso conduce a la formación de una masa viscosa y pegajosa de olor característico, la aparición de un cambio de coloración de crema a marrón en las larvas y la presencia de escamas secas en las celdillas del panal (Daisley *et al.*, 2020b). De manera que, si se suministran sistemáticamente las bacterias probióticas, pudieran colonizar el tracto digestivo de las larvas y así, inhibir la germinación de las esporas y prevenir la enfermedad.

Existen discrepancias con trabajos previos realizados por Stephan *et al.* (2019). Estos científicos refieren en su estudio, que las bacterias ácido lácticas no tienen efecto sobre el patógeno a nivel de colonia. Este resultado podría explicarse por el hecho de que la administración de las bacterias se realizó en una solución de sacarosa al 15% como vehículo, lo que probablemente resultó en una marcada reducción de la viabilidad celular bacteriana, dado que se sabe que este medio induce estrés osmótico severo y no todas las especies del género *Lactobacillus* tienen la capacidad de resistir en estos ambientes (Sionek *et al.*, 2024).

Resultados superiores a los informados en esta investigación se detectaron por Truong *et al.* (2023), quienes determinaron el efecto inhibitorio de seis bacterias ácido lácticas frente a *P. larvae* en larvas durante un período de cinco días. Los resultados muestran que cuando las larvas se alimentaron con *L. kullabergensis* OMG2\_B25, solo sobrevivieron el 64,71% de ellas, valor que fue más bajo con respecto al grupo tratado con *P. larvae* (68,97%). Sin embargo, se observó un incremento de la tasa de supervivencia cuando se utilizaron las cepas *L. mellis* OMG2\_B33 (77,78%), *L. apis* HSY8\_B25 (78,95%), *L. panisapium* PKH2\_L3

(84,21%), *L. kimbladii* AHS3\_B36 (90,48%) y *L. melliventris* HSY3\_B5 (90,48%) así como la mezcla de las seis con un valor de 94,44%.

En los últimos años, el uso de *Lactobacillus* se considera una alternativa sostenible para el control de la LA. La actividad antimicrobiana de este género contra *P. larvae* es multifactorial. Se distingue por la producción de metabolitos antimicrobianos como el ácido láctico, el ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que pueden inhibir el crecimiento de este patógeno (Kačániová *et al.*, 2020). También inciden en la competencia por nutrientes, adhesión a superficies y en la modulación del sistema inmune de las abejas (Daisley *et al.*, 2020b). Otro factor influyente lo constituye el incremento de las interacciones sinérgicas con otros microorganismos en el tracto digestivo. El efecto antimicrobiano de *Lactobacillus* puede potenciarse por la presencia de otras bacterias beneficiosas del microbioma de la abeja, como *Bifidobacterium* y *Gilliamella apicola*, ya que se genera un ambiente hostil para *P. larvae* (Raymann & Moran, 2018).

Aunque aún se requieren investigaciones más profundas en condiciones reales de campo, los resultados preliminares sugieren que los probióticos representan una herramienta prometedora para la prevención de la LA sin comprometer la salud de las colonias ni generar resistencias antimicrobianas.

Existe evidencia sustancial de estudios de laboratorio *in vitro* que sugieren que los microorganismos beneficiosos podrían ser un método eficaz para mejorar la resistencia a las enfermedades en las abejas melíferas. Sin embargo, falta evidencia a nivel de colonia y existe una necesidad urgente de mayor validación mediante ensayos de campo controlados diseñados experimentalmente para probar composiciones microbianas definidas contra enfermedades específicas de interés (Rodríguez *et al.*, 2023).

### **Conclusiones parciales**

1. El biopreparado de *Lactobacillus* L31 demostró *in vitro* actividad antibacteriana frente a *P. larvae*, avalada por la inhibición total de este

microorganismo frente al cultivo potencialmente probiótico y la alta coagregación y auto-agregación.

2. Se demostró *in vitro* la reducción del crecimiento de *P. larvae* cuando se cultiva en conjunto con *Lactobacillus* L31 a través de co-cultivos en el mismo medio.
3. La aplicación del biopreparado *Lactobacillus* L31 en el alimento disminuyó la mortalidad de las larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae*.

## Consideraciones finales

En las últimas décadas, se observó la pérdida de grandes poblaciones de abejas en todo el mundo. Diferentes factores bióticos y abióticos, así como la interacción entre ellos, son responsables de la disminución de las abejas, pero aún no se identifican las causas definitivas. La abeja *A. mellifera* se encuentra amenazada por diversas enfermedades y tensiones ambientales que afectan a la microbiota intestinal de estos insectos, la cual es fundamental para el metabolismo, el desarrollo y la inmunidad del huésped. Con el objetivo de preservar la homeostasis intestinal, muchas investigaciones se centran actualmente en mejorar la salud de las abejas melíferas mediante la administración de probióticos, ya que estos aumentan la respuesta inmune innata contra las infecciones microbianas (Abdi *et al.*, 2023).

*Lactobacillus* es un género de bacterias ácido-lácticas que se encuentra naturalmente en el tracto digestivo de las abejas. Algunas cepas tienen propiedades probióticas, ya que son seguras para el hospedador, pueden sobrevivir en condiciones intestinales adversas, producen compuestos antimicrobianos, estimulan el sistema inmunológico, inhiben a patógenos como *P. larvae*, mejoran la digestión y absorción de nutrientes, aumentan la longevidad y la actividad de las abejas obreras. Además, previenen enfermedades sin recurrir a los antibióticos, mejoran la producción de miel y favorecen la recuperación de colmenas debilitadas (Ramos *et al.*, 2020; Nowak *et al.*, 2021). Por todas estas razones se decidió aislar y seleccionar cepas del género *Lactobacillus* para la obtención de un biopreparado probiótico, que en primera instancia prevenga la incidencia de la LA en las abejas.

Los resultados del presente trabajo se integran en cuatro aspectos principales: el aislamiento, la caracterización y la selección de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de abejas melíponas; el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31, el estudio de la estabilidad del biopreparado bajo condiciones de almacenamiento, la evaluación de la seguridad de aplicación del biopreparado en abejas de la especie *A. mellifera* y, por último, la

determinación *in vivo* de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* L31 en larvas de *A. mellifera* infectadas con *P. larvae*. Estos ensayos se interrelacionan para dar lugar al resultado final, la obtención de un biopreparado probiótico, a partir del cultivo de *Lactobacillus* L31, con una comprobada actividad antibacteriana frente a *P. larvae*.

La secuencia experimental que se desarrolló en este trabajo resultó apropiada para seleccionar las posibles cepas probióticas, ya que el aislamiento se realizó directamente del tracto digestivo de abejas meliponas, un ecosistema poco conocido, pero con grandes posibilidades de obtener cepas con gran potencial probiótico, por las propiedades antimicrobianas que presenta la miel de estos insectos y por la resistencia de estas abejas a las enfermedades. Por otra parte, se utilizaron pruebas que garantizaron el proceso de selección, tales como la capacidad de crecimiento, la producción de ácidos orgánicos, la resistencia a las condiciones osmóticas del jarabe, la hidrofobicidad y por supuesto, la inhibición de *P. larvae* a escala de laboratorio.

La selección *in vitro* de la cepa que se utilizó en la obtención del biopreparado arrojó que *Lactobacillus* L31 tenía superior capacidad de crecimiento, alta producción de ácido láctico, elevada hidrofobicidad y una efectiva actividad antimicrobiana frente *P. larvae*. Una característica distintiva fue su supervivencia a las altas concentraciones de sacarosa en el jarabe, lo que decidió su selección.

La mayoría de las especies bacterianas utilizadas en los probióticos comerciales no son nativas de los intestinos de las abejas. Motta *et al.* (2023) presentaron nuevos resultados experimentales donde se demuestra que las bacterias intestinales nativas de abeja colonizan vigorosamente, mientras que las bacterias presentes en un probiótico comercial no se establecían en el TGI de estos insectos. Por su parte, Robino *et al.* (2024) afirmaron que la alimentación con una mezcla de probióticos indujo a efectos inmunológicos beneficiosos y promovió una microbiota intestinal

equilibrada, con actividades metabólicas mejoradas relacionadas con la digestión. Demostraron que el uso de probióticos altamente seleccionados contribuye al bienestar general de las abejas y a la salud e integridad del TGI.

El hecho de aislar lactobacilos del TGI de *M. beecheii* debió incidir en su efecto antimicrobiano frente a *P. larvae*. La microbiota poco explorada de estas abejas debe contar con especies productoras de sustancias antibacterianas muy potentes, que hacen incluso que su miel tenga efectos superiores en la eliminación de microorganismos patógenos (Cerqueira *et al.*, 2024). Los halos de inhibición detectados por el método de difusión de sustancias en el agar, superiores a los 40 mm y la inhibición total observada en el método de “agar spot”, no se observaron en bacterias procedentes del tracto digestivo de *A. mellifera* evaluadas en otros trabajos (Rodríguez *et al.*, 2021; Martínez *et al.*, 2025).

Actualmente no se dispone de métodos satisfactorios para el tratamiento de la LA, principalmente debido a las dificultades para erradicar las tenaces esporas producidas por el agente etiológico *P. larvae* (Manhong *et al.*, 2023). Los resultados de los co-cultivos con *Lactobacillus* L31 y *P. larvae* demostraron que la inhibición del crecimiento no estuvo dada por la disminución del pH, probablemente alguna sustancia de tipo bacteriocina debió producirse, lo cual se necesita esclarecer en un futuro.

La aplicación de *Lactobacillus* L31 como probiótico en abejas adultas resultó segura, ya que se conoce que estos microorganismos son parte importante de la comunidad intestinal y sus actividades beneficiosas tienen alta implicación en la salud de las abejas. El conocimiento de la microbiota intestinal natural brinda la oportunidad de crear una estrategia amplia para la vitalidad de las abejas, incluido el desarrollo de preparaciones probióticas modernas, para usar en lugar de antibióticos convencionales, biocidas ecológicos y agentes de control biológico (Nowak *et al.*, 2021).

La evaluación inicial se puede realizar en un laboratorio para probar de manera eficiente múltiples parámetros, pero las afirmaciones se deben hacer a partir de ensayos de campo donde las abejas melíferas pueden comportarse naturalmente (Henry *et al.*, 2015). De ahí que, aunque los resultados del presente trabajo resultan prometedores, deberán validarse a ese nivel.

El diseño de medios de cultivo simples y económicos es uno de los aspectos más importantes para el proceso de obtención de probióticos a escalas industriales (Sánchez *et al.*, 2019; Sosa-Cossio *et al.*, 2025). En este sentido, se diseñó y optimizó un medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus* L31, el cual cuenta en gran medida, con componentes nacionales como la miel final de caña de azúcar y el HELSc. Cuando se cultivó *Lactobacillus* L31 en el medio MCL31 y se compararon los resultados de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación con los que se obtienen en el medio MRS (medio de referencia), se observaron efectos similares. Estos resultados indican que la composición óptima de azúcares reductores totales y nitrógeno total en el nuevo sustrato, cubrió los requerimientos nutricionales de los lactobacilos que se cultivaron.

Aunque los resultados de la estabilidad del biopreparado húmedo son superiores a los observados en otros trabajos (Brizuela, 2003; Rondón, 2009), se necesitan métodos más eficientes para su conservación. Resulta necesario explorar otras técnicas de preservación microbiana, pero que, a la vez no encarezcan el costo de producción del producto en gran cuantía.

La preocupación por la salud de las abejas melíferas y el colapso de las colonias despertó mayor interés en la intervención de las bacterias beneficiosas. Chmiel *et al.* (2021) realizaron un metaanálisis de los efectos reportados en estudios publicados en el período 2004-2020, donde se evaluó experimentalmente la influencia de las bacterias beneficiosas, incluidos los probióticos, en la función inmunitaria de las abejas melíferas, la resistencia a patógenos o la productividad de

las colonias. Este estudio muestra que la intervención bacteriana puede mejorar la supervivencia de las abejas frente a la LA y la infección por *Nosema*. También aumenta la producción de miel, pero los mecanismos moleculares subyacentes son poco conocidos. Los autores también abogan por un enfoque más organizado y transparente que incluya la justificación de la selección y administración de cepas, una descripción detallada de las formulaciones de tratamiento, los recuentos de viables y su aplicación en las colmenas, así como un mejor diseño de los ensayos de campo que incluyan sistemáticamente controles y otras características que permitan la interpretación de los resultados.

El presente trabajo inicia las pautas para la utilización de especies con potencial probiótico aisladas del ecosistema intestinal de *M. beecheii*. Existen evidencias que demuestran que el género *Lactobacillus* es el predominante en este ambiente (Cerqueira *et al.*, 2021; Ramírez- Ahuja *et al.*, 2025) y es muy probable que se presenten especies con alta actividad antimicrobiana. Se plantea que el microbioma de la abeja melífera, el cual está bien estudiado, alberga a más de 43 especies de BAL en las colmenas, de las cuales, 20 mostraron inhibición frente a 28 especies de patógenos humanos y animales, algunas de las cuales fueron resistentes a los antibióticos. Además, en la literatura se hace referencia a que existe una relación directa entre la presencia de BAL y sus productos en la colmena, con las propiedades antibacterianas de la miel y el polen (Ramos *et al.*, 2020). Por tanto, investigaciones futuras deberán enfocarse en la búsqueda de bacterias probióticas en las abejas meliponas, no solo para las abejas, sino también para otros animales.

Hasta la fecha, en Cuba no se producen ni se emplean probióticos comerciales para mejorar la salud de las abejas *A. mellifera*. Desde el punto de vista práctico, los resultados del presente trabajo brindan la metodología de obtención de un biopreparado probiótico a partir de *Lactobacillus* procedentes de la especie *M. beecheii* (figura 18).

Esta investigación constituye el paso inicial de otros experimentos que están por desarrollarse para comprobar el efecto del biopreparado como control biológico de diferentes enfermedades producidas por hongos, bacterias, virus o ectoparásitos que afectan a las crías y abejas adultas. Para la apicultura cubana representaría contar con una estrategia viable para la prevención de estas patologías y mejorar la producción de miel.

Estudios futuros estarán encaminados a la evaluación del efecto de este biopreparado en los indicadores productivos y su incidencia en la calidad de la miel. También en lograr otras vías de administración que propicien la colonización de todos los miembros de la colmena, de esta forma estarán más protegidos para resistir el ataque de microorganismos patógenos.

# *Conclusiones*

## CONCLUSIONES

1. La cepa *Lactobacillus* L31 aislada del tracto digestivo de *Melipona beecheii* B., demostró características potenciales para emplearse como candidata a probiótico en abejas.
2. El nuevo medio de cultivo que se optimizó para el crecimiento de *Lactobacillus* L31, con el empleo de componentes nacionales, contiene los requerimientos nutricionales para el desarrollo de una población superior a  $12 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ , con una viabilidad estable hasta los 90 días de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como en condiciones de refrigeración.
3. La inclusión del biopreparado con *Lactobacillus* L31 en el alimento mostró seguridad de aplicación, al evidenciarse mayor tasa de supervivencia en abejas adultas y superior colonización de BAL en el tracto digestivo.
4. El biopreparado con *Lactobacillus* L31 demostró efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Paenibacillus larvae* y redujo *in vivo* la mortalidad de las larvas de *Apis mellifera* L. infectadas con el agente causal de la Loque americana en estos insectos.

# *Recomendaciones*

## **RECOMENDACIONES**

1. Comprobar el efecto del biopreparado probiótico frente a *P. larvae* en condiciones de campo controladas, así como frente a otras enfermedades de importancia apícola.
2. Determinar el efecto del biopreparado probiótico en los indicadores productivos y económicos de las abejas.
3. Identificar la naturaleza química de las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus* L31 y la taxonomía de esta cepa por técnicas de biología molecular.
4. Incorporar los resultados de la investigación en la formación académica de estudiantes de pregrado y postgrado.

## *Referencias bibliográficas*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, K., Ben Said, M., Crotti, E., Masmoudi, A.S., & Cherif, A. (2023). The promise of probiotics in honeybee health and disease management. *Arch Microbiol* 205, 73. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03416-z>
- Acosta-Piantini, E., Rodríguez-Díez, E., Chavarri, M., López-De-Armentia, I., Villaran, M.C., Lombraña, J. I. (2023). Preparation of hydrolyzed sugarcane molasses as a low-cost medium for the mass production of probiotic *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Separations*, 10(1):33. <https://doi.org/10.3390/separations10010033>
- Adzuan, A. S. S., Mohamad, S. A. S., Kamal, N. N. S. M., Mutalib, N. A., Hasbullah, N. I., Ibrahím, R., & Amin, M. C. I. B. M. (2022). Characterization of probiotic properties and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from stingless bee gut. *International Journal of Health Sciences*, 6(S8), 6054–6063. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS8.13707>
- Alayande, K. A., Aiyegoro, O. A., & Ateba, C. N. (2020). Probiotics in animal husbandry: applicability and associated risk factors. *Sustainability*, 12(3), 1087. <https://doi.org/10.3390/su12031087>
- Alberoni, D., Baffoni, L., Braglia, C., Gaggia, F., & Di Gioia, D. (2021). Honeybees Exposure to Natural Feed Additives: How Is the Gut Microbiota Affected? *Microorganisms*, 9(5), 1009. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051009>
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., & Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honeybees: Problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 9469–9482. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7870-4>
- Al-Ghamdi, A.; Khan, K. A.; Ansari, M.J.; Almasaudi, S. B. & Al-Kahtani, S. (2018). Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. *Saudi J. Biol. Sci.* 25(2): 383–387. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.005>

- Alvarado, I., Phui, A., Elekonich, M. M., & Abel-Santos, E. (2013). Requirements for *in vitro* germination of *Paenibacillus larvae* spores. *J. Bacteriol.*, 195(5), 1005–1011. <https://doi.org/10.1128/JB.01958-12>
- Al-Wahab, M.A., Al-Fattah, A., Ibrahim, Y.Y., El Moghazy, G.M., & Madkour, M.Z. (2023). Effect of lactic acid and probiotics as growth promoters in honeybee's nutrition. *Egypt. J. Chem.*, 66(5), 83–86. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2022.120566.5426>
- Al-Yami, A. M., Al-Mousa, A. T., Al-Otaibi, S. A., & Khalifa, A. Y. (2022). *Lactobacillus* species as probiotics: isolation sources and health benefits. *J. Pure Appl. Microbiol*, 16(4), 1761-1770. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.19>
- Andrearczyk, S., Kadhim, M. J., & Knaga, S. (2014). Influence of a probiotic on the mortality, sugar syrup ingestion and infection of honeybees with *Nosema* spp. under laboratory assessment. *Med. Weter*, 70(12), 762-765.
- Anon. 2017. Anatomía digestiva de las abejas. Corona apicultores. Disponible en: <http://coronaapicultura.blogspot.com/2017/03/anatomia-digestiva-de-las-abejas.html>. Fecha de consulta: 4 de abril de 2025.
- 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*, 129-131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.008>
- AOAC Official Method 947.05. (2023). Acidity of Milk: Titrimetric Method', in Dr. G. W. Latimer, Jr (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*, 22nd Edition (New York, 2023; online edn, AOAC Publications, 4 Jan. 2023). <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.3040>
- Arredondo, D. (2015). Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas melíferas. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. PEDECIBA. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/26659>
- Arredondo, D., Castelli, L., Porrini, M. P., Garrido, P. M., Eguaras, M. J., Zunino, P., & Antúnez, K. (2018). *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey

bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Beneficial microbes*, 9(2), 279-290. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0075>

Astolfi, M.L., Conti, M.E., Messi, M., & Marconi, E. (2022). Probiotics as a promising prophylactic tool to reduce levels of toxic or potentially toxic elements in bees. *Chemosphere*, 308(1): 136261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136261>

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. <https://doi.org/10.3920/BM2010.0024>

Bamisi, O. F., Ogidi, C. O., Akinyele, B. J. (2024). Antimicrobial metabolites from probiotics, *Pleurotus ostreatus* and their co-cultures against foodborne pathogens isolated from ready to eat foods. *Annals of Microbiology*, 74, 31. <https://doi.org/10.1186/s13213-024-01776-5>.

Besharati, M., Bavand, R., Paya, H., & Lackner, M. (2024). Comparative effect of probiotic and antibiotic on honey bees colony functional traits. *The EuroBiotech Journal*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2024-0001>

Betancur, C. A., Rondón, Ana J., Martínez, Y., & Rodríguez, R. (2020). Formulación y caracterización de un biopreparado con *Lactobacillus plantarum* CAM-6, procedente del tracto digestivo de cerdos criollos colombianos. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(3), 395-404. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802020000300395&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000300395&lng=es&tlng=es).

Borges, D., Guzman-Novoa, E., & Goodwin, P. H. (2021). Effects of prebiotics and probiotics on honey bees (*Apis mellifera*) infected with the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Microorganisms*, 9(3), 481. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030481>

Brar, G., Ngor, L., McFrederick, Q. S., Torson, A. S., Rajamohan, A., Rinehart, J., Sigh, P., & Bowsher, J. H. (2025). High abundance of lactobacilli in the gut microbiome of

honey bees during winter. *Scientific Reports*, 15(1), 7409. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90763-0>

Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba

Bueno, E. B. T., Silva, K. d. O., Mendes, M. E. F., de Oliveira, L. B., Menezes, F. P. d., Imperador, A. C., Correia, L. F., & Winkelstroter, L. K. (2025). Postbiotics derived from lactic acid bacteria fermentation: therapeutic potential in the treatment of muscular complications in inflammatory bowel disease. *Fermentation*, 11(7), 362. <https://doi.org/10.3390/fermentation11070362>

Bulson, L.; Becher, M. A.; McKinley, T. J. & WilferT, L. (2021). Long-term effects of antibiotic treatments on honeybee colony fitness: A modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 58 (1): 70–80. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13786>

Budge, G. E. (2020). The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and its relationship with European foulbrood. *Journal of Apicultural Research*, 59(3), 294–303. <https://hdl.handle.net/10.1016/j.jip.2010.06.004>

Cabana, M.J., Tejerina, M.R., José, J., Castro, R.M., & Benítez Ahrendts, M.R. (2021). Probiotic potential of bacteria isolated from pollen bread to improve the production and health of *Apis mellifera*. *Idesia*, 39(1). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292021000100045>

Carvajal, R.I, Silva-Mieres, F., Ilabaca, A., Rocha, J., Arellano-Arriagada, L., Zúñiga Arbalti, F.A., & García-Cancino, A. (2023). Aislamiento y caracterización de *Lactobacillus casei* A14.2, una cepa con actividad inmunomoduladora sobre *Apis mellifera*. *Ciencia Saudí J Biol.*, 30(4), 103612. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103612>

Castro-Bravo, N., Wells, J.M., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. 2018. Interacciones de exopolisacáridos superficiales de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el ambiente intestinal. *Front Microbiol.*, 9, 2426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>

- Cerqueira, A. E. S., Lima, H. S., Silva, L. C. F., Veloso, T. G. R., de Paula, S. O., Santana, W. C., & da Silva, C. C. (2024). Melipona stingless bees and honey microbiota reveal the diversity, composition, and modes of symbionts transmission. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae063>
- Chin, W.L., Kee, P.E., Ng, H.S., Lan, J.C.W.; Tan, J.S. (2024). Selective screening *Lactobacillus* spp. against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and optimizing a cane molasses-based medium with *Lactobacillus acidophilus* as a guiding model. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 160:105197. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105197>
- Chmiel, J.A., Pitek, A.P, Thompson, G.J., Burton, J.P., & Reid, G. (2021). Meta-analysis on the effect of bacterial interventions on honey bee productivity and the treatment of infection. *Apidologie*, 52, 960-972. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00879-1>
- Cossio, D. S., Hernández, Y. G., Mendoza, J. C. D., Ceijas, A. S., Curbelo, Y. G., Hernández, Y. G., & Dorta, N. A. (2024). Stability and preservation of the probiotic additive with *Lactobacillus pentosus* LB-31 for animal production. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 58, cu-id. <https://cu-id.com/1996/v58e19>
- Cuesta-Maté, A., Renelies-Hamilton, J., Kryger, P., Jensen, A.B., Sinotte, V.M., & Poulsen, M. (2021). Resistance and vulnerability of honeybee (*Apis mellifera*) gut bacteria to commonly used pesticides. *Front. Microbiol.*, 12, 717990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717990>
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Al, K. F., Chernyshova, A. M., Faragalla, K. Burton, J. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020b). Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *ISME J.*, 14(2), 476-491. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>
- Daisley, B. A., Pitek, A. P., Chmiel, J. A., Gibbons, S., Chernyshova, A. M., Al, K. F., Faragalla, K. M., Burton, J. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020a). *Lactobacillus* spp. attenuate antibiotic-induced immune and microbiota dysregulation in honey

bees. *Communications biology*, 3(1), 534. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01259-8>

Daisley, B. A., Pitek, A. P., Torres, C., Lowery, R., Adair, B. A., Al, K. F., Niño, B., Burton, J. P., Allen-Vercoe, E., Thompson, G. J., Reid, G., & Niño, E. (2023). Delivery mechanism can enhance probiotic activity against honey bee pathogens. *The ISME journal*, 17(9), 1382–1395. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01422-z>

D'Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M. & Hasselmann, M. (2023). Biofilm formation enhances the virulence of *Paenibacillus larvae*. *PLOS Pathogens*, 19(3), e1011216. <https://dx.doi.org/10.1128/AEM.02393-21>

De La Rosa, A. K., Vasquez García, A., Betancourt, S. P., Andrade, E. N., Bermúdez Medina, D. F., Diaz Arce, K. S., Ascacio, J. A., & Londoño Hernández, L. (2023). Evaluación de medios de cultivos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas probióticas y su potencial uso en alimentación de aves de corral. *Publicaciones e Investigación*, 17(4). <https://doi.org/10.22490/25394088.7507>

De Man, J.C., Rogosa, M., & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 23(1):130-135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

Del Hoyo, M. (1998). Use of DHT equipment of AFB-contaminated beehive materials in Argentina. *Journal of the American Beekeeping Association*, 138(10), 738-740.

Dengiz, B., Killer, J., Havlík, J., Dobeš, P., & Hyršl, P. (2025). Selection of Probiotics for Honey Bees: The *in vitro* inhibition of *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, and *Serratia marcescens* Strain Sicaria by Host-Specific Lactobacilli and Bifidobacteria. *Microorganisms*, 13(5), 1159. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13051159>

dos Santos Filhoa, A.L., Veloso Freitas, H., Rodrigues, S., Gonçalves Abreu, K., de Oliveira Lemos, T., Faria Gomes, W., Naraind, N. & Fernandes Pereira, A.L. 2019. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute

during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 99: 371-378, ISSN: 0023-6438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.007>

Ebeling, J., Fünfhaus, A. & Genersch, E. (2021). The Buzz about ADP Ribosylation Toxins from *Paenibacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood in Honey Bees. *Toxins (Basel)*, 13(2), 151. <https://doi.org/10.3390/toxins13020151>

El-Didamony, S. E., Gouda, H. I., Zidan, M. M., & Amer, R. I. (2024). Bee products: An overview of sources, biological activities and advanced approaches used in apitherapy application. *Biotechnology Reports*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00862>

Elenany, Y. E., & Hassan, A. A. M. (2023). Beneficial effect of honeybee-specific lactic acid bacteria on health and activity of *Apis mellifera* L. colonies. *Bulletin of the National Research Centre*, 47(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s42269-023-00997-z>

Elzeini, H. M., Ali, A. R. A. A., Nasr, N. F., Hassan, M., Hassan, A. A. M., & Elenany, Y. E. (2021). Probiotic capability of novel lactic acid bacteria isolated from worker honey bees gut microbiota. *FEMS Microbiology Letters*, 368(6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab030>

Engels, P., James, R. R., Koga, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., & Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1-24. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>

Evans, J. D. (2003). Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 46–50. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00039-9)

Faleiros-Quevedo, M., & Franco, T. M. (2022). Stingless bees honeys': physical-chemical characterization, difficulties and challenges. *Research, Society and Development*, 11(6), e25411628996-e25411628996. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28996>

Fang, P., Lei, Q., Lv, M., Xu, L., Dong, K., Zhao, W., Yue, D., Cao, Z., & Lin, Q. (2023). Effects of the combination of *Lactobacillus helveticus* and isomalto-oligosaccharide on survival, gut microbiota, and immune function in *Apis cerana* worker bees. *Letters in Applied Microbiology*, 76(12), ovad134. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovad134>

- Feketéné, A., Szűcs, I., & Bauerné, A. (2023). Evaluation of the pollination ecosystem service of the honey bee (*Apis mellifera*) based on a beekeeping model in Hungary. *Sustainability*, 15(13), 9906. <https://doi.org/10.3390/su15139906>
- Fernández-Roblero, S., Grajales-Conesa, J., Rincón Rabanales, M., Coronel-Niño R., & Vázquez-Ovando, A. (2020). Lactic acid bacteria isolated from the stingless bee honey *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Revista Bio Ciencias*, 7. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e979>
- Fonte, L. (2022). Base alimentaria y estado de salud en colmenas de dos meliponarios de Matanzas y Mayabeque, Cuba. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Cuba.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health organization. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria [homepage en Internet]. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)
- García Hernández, Y., Sosa Cossio, D., Lorenzo García, Y., Casañas Sosa, P. J., Gutiérrez Fernández, L., & Mojarena Sánchez, Y. (2018). Evaluación de un medio de cultivo para *Lactobacillus pentosus* LB-31, promotor del crecimiento animal. *Revista Ciencia Universitaria*, 15(1). <https://revistas.unah.edu.cu/index.php/cu/article/view/948>
- García-Ochaeta, J. F. (2020). Primer registro del pequeño escarabajo de la colmena *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae) en colmenas de abejas africanizadas en Guatemala. *Insecta Mundi* 0826:1–4. <http://centerforsystematicentomology.org/>
- García-Vicente, E. J., Benito-Murcia, M., Martín, M., Pérez, A., Hermosilla, N., Alonso, J. M., & Risco, D. (2025). Evaluation of Combined Use of Protein and Postbiotics Feed Supplements in Honey Beehives in Autumn and Spring. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10489-3>

- García-Vicente, E. J., Benito-Murcia, M., Martín, M., Rey-Casero, I., Pérez, A., González, M., Alonso, J. M., & Risco, D. (2024). Evaluation of the potential effect of postbiotics obtained from honey bees against *Varroa destructor* and their combination with other organic products. *Insects*, 15(1), 67. <https://doi.org/10.3390/insects15010067>
- García-Vicente, E. J., Benito-Murcia, M., Martín, M., Rey-Casero, I., Pérez, A., González, M., & Risco, D. (2024). Evaluation of the potential effect of postbiotics obtained from honey bees against *Varroa destructor* and their combination with other organic products. *Insects*, 15(1), 67. <https://doi.org/10.3390/insects15010067>
- Gayathri, L. & Krubha, A. (2021). *Bacillus* Species—Elucidating the dilemma on their probiotic and pathogenic traits. In Advances in Probiotics; Dhanasekaran, D., Sankaranarayanan, A., Eds.; *Academic Press: Amsterdam, The Netherlands*, pp. 233–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00015-0>
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J. & Fries, I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501-511. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0>
- Goh, L. P. W., Molujin, A. M., Muthu, K., Abdulla, R., Sabullah, M. K., Mohd Faik, A. A., Gansau, J. A., & Jawan, R. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Sabah (North Borneo) stingless bees for probiotic and food applications. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 564–578. <https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1900238>
- Grinn-Gofroń, A., Kołodziejczak, M., Hryniewicz, R., Lewandowski, F., Bębnowska, D., Adamski, C., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2025). Antimicrobial Potential of Bee-Derived Products: Insights into Honey, Propolis and Bee Venom. *Pathogens*, 14(8), 780. <https://doi.org/10.3390/pathogens14080780>

- Guo, Z., Zhang, J., Wang, Z., Ang, K. Y., Huang, S., Hou, Q., Su, X., Qiao, J., Zheng, Y. & Wang, L. (2016). Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans. *Sci. Rep.* 6: 20602. <https://doi.org/10.1038/srep20602>
- Hariprasath, K., Mohankumar, S., Sudha, M., Saranya, N & Saminathan, V.R. (2025a). The Role of honeybee gut and honey microbiome in sustainable bee and human health. *J Pure Appl Microbiol*, 19(1):19-33. <https://doi.org/10.22207/JPAM.19.1.03>
- Hariprasath, K., Dhanvarsha, M., Mohankumar, S., Sudha, M., Saranya, N., Saminathan, V. R., & Subramanian, S. (2025b). Characterization of gut microbiota in *Apis cerana* across different altitudes in the Peninsular India. *BMC Ecology and Evolution*, 25(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12862-025-02349-z>
- Harrigan, W. F. & McCance, M. E. (1966). Métodos de laboratorio de Microbiología. León, España: Editorial Academia.
- Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayraud, M., Odoux, J. F, Pissard, A., Rüger, C., & Bretagnolle, V. (2015). Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1819), 20152110. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2110>
- Hernández-García, J. E., Rodríguez Díaz, J. A., Estrada-Cutiño, O., Solenzal-Valdivia, Y., Fernández-León, K. J., & Rondón-Castillo, A. J. (2021). Potencialidades de la utilización de aditivos zootécnicos en la apicultura cubana. *Pastos y Forrajes*, 44. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942021000100014&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942021000100014&lng=es&tlng=pt).
- Hernández-García, J. E., Sebastián-Frizzo, L., Rodríguez-Fernández, J. C., Valdéz-Paneca, G., Virginia-Zbrun, M., & Calero-Hernández, I. (2019). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Rev. Salud Animal*, 41(1). <https://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1008>
- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from lactic acid bacteria. A

powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*, 11(4), 979. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>

Honey Chandran, C. & Keerthi, T. R. (2018). Probiotic potency of *Lactobacillus plantarum* KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 365 (4): fnx285. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx285>

Hornitzky, M. A. Z. & Karlovskis, S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *J. Apicult. Res.* 28: 118–120. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100831>

Hudzicki, J. (2009). Bauer-Kirby disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, 15(1), 1-23. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Bauer-Kirby-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol-pdf.pdf>

Imani, A., Kalami, H., Mazaheri, J y Hamidian, G. (2022). *Vairimorpha ceranae* was the only detected microsporidian species from Iranian honey bee colonies: a molecular and phylogenetic study. *Parasitology Research* 121, 355–366. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34792656/>

Iorizzo, M., Letizia, F., Ganassi, S., Testa, B., Petrarca, S., Albanese, G., Di Criscio, D., & De Cristofaro, A. (2022). Functional Properties and Antimicrobial Activity from Lactic Acid Bacteria as Resources to Improve the Health and Welfare of Honey Bees. *Insects*, 13(3), 308. <https://doi.org/10.3390/insects13030308>

Iorizzo, M., Testa, B., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M. & De Cristofaro, A. (2020). Antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: potential benefits for honeybee health. *Antibiotics* 9, 442. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080442>

Ivars, J. (2022). La microbiota intestinal en las abejas ¿Qué papel juega? La Tienda del Apicultor. <https://www.latiendadelapicultor.com/blog/la-microbiotaintestinal-en-las-abejas-que-papel->

[juega/?srsltid=AfmBOopFUyToeFeSFZ4TrNwzTe3AW1\\_FXYwyG1S6dFdslPwhVvfUysXd.](https://doi.org/10.3390/insects13090844)

- Jabal-Uriel, C., Barrios, L., Bonjour-Dalmon, A., Caspi-Yona, S., Chejanovsly, N., Erez, T., Henriques, D., Higes, M., Le Conte, Y., Lopes, A. R., Meana, A., Pinto, M. A., Reyes-Carreño, M., Soroker, V., & Martín-Hernández, R. (2022). Epidemiology of the Microsporidium *Nosema ceranae* in four mediterranean countries. *Insects*, 13(9), 844. <https://doi.org/10.3390/insects13090844>
- Kačániová, M.; Terentjeva, M.; Žiarovská, J. & Kowalczewski, P. L. (2020). *In vitro* antagonistic effect of gut bacteriota isolated from indigenous honey bees and essential oils against *Paenibacillus larvae*. *Int. J. Mol. Sci.* 21(18): 6736 <https://doi.org/10.3390/ijms21186736>
- Kavak, A. E., Selen, V., & Tamtürk, F. (2022). Optimization of media composition for maximum growth of probiotic *Lactobacillus fermentum* NBC-08 using Response Surface Methodology. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 32(1): 69-80. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.993781>
- Kaznowski, A., Szymas, B., Jazdzinska, E., Kazmierczak, M., Paetz, H., & Mokracka, J. (2005). The effects of probiotic supplementation on the content of intestinal microflora and chemical composition of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of apicultural research*, 44(1), 10-14. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101139>
- Kim, H., Maigoro, A.Y., Lee, J.-H., Frunze, O., & Kwon, H. W. (2024). The improving effects of probiotic-added pollen substitute diets on the gut microbiota and individual health of honey bee (*Apis mellifera* L.). *Microorganisms*, 12(8), 1567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081567>
- Kwong, W. K., Engel, P., Koch, H., Moran, N. A. (2014). Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *PNAS* 111, 11509–11514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405838111>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews. Microbiology*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>

- Lamei, S. (2018). *The effect of honeybee-specific Lactic Acid Bacteria on American foulbrood disease of honeybees* (No. 2018: 23).
- Larsen, A., Reynaldi, F. C., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Bases del sistema inmune de la abeja melífera (*Apis mellifera*). Revisión. *Rev. mex. de cienc. Pecuarias*, 10(3). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4785>
- Leska, A., Nowak, A., Rosicka-Kaczmarek, J., Ryngajłło, M., & Czarnecka-Chrebelska, K. H. (2023). Characterization and protective properties of Lactic Acid Bacteria intended to be used in probiotic preparation for honeybees (*Apis mellifera* L.) an *in vitro* study. *Animals*, 13(6), 1059. <https://doi.org/10.3390/ani13061059>
- Levene, H. (1960). Robust tests for the equality of variance. *Contributions to Probability and Statistics*. Stanford University Press: 278-292. <https://doi.org/10.2307/2285659>
- Liew, S. L., Ariff, A. B., Raha, A. R., Ho, Y. W. (2005). Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.009>
- Lilly, D.M. & Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci.* 147:747-748.
- López, M. & Underwood, R. (2023). Enfermedades de las abejas: Loque americana. PennState Extension. The Pennsylvania State University. <https://pollinators.psu.edu/assets/uploads/documents/Enfermedades-de-laAbeja-de-Miel-Loque-Americana.pdf>
- 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, 47-51. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/537/492>
- Manhong, Y., Xiaoyuan. L., Fengping. Y., & Bin Z. (2023). Beneficial bacteria as biocontrol agents for american foulbrood disease in honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of Insect Science*, 23(2), 6. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iead013>

- Marche, M.G., Satta, A., & Floris, I. (2019). Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from *Varroa*-infested colonies. *Journal of Apicultural Research*, 58(3), 444-454. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2019.1589669>
- Martínez Mora, M. M., Rondón Castillo, A. J., Pérez Rojas, A. & Cepero Pereira, E. (2025). Propiedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. aislados del tracto digestivo de *Melipona beecheii*. *Rev. Prod. Anim.*, 37. <https://apm.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e173>
- Martins, A. C., Proença, C. E., Vasconcelos, T. N., Aguiar, A. J., Farinasso, H. C., de Lima, A. T., & Keller, A. (2023). Contrasting patterns of foraging behavior in neotropical stingless bees using pollen and honey metabarcoding. *Scientific Reports*, 13(1), 14474. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41304-0>
- Mathialagan, M., Edward, Y. S., David, P. M. M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M. R., & 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. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.096>
- Meradji, M., Bachtarzi, N., Mora, D., & Kharroub, K. (2023). Characterization of lactic acid bacteria strains isolated from Algerian honeybee and honey and exploration of their potential probiotic and functional features for human use. *Foods*, 12, 2312. <https://doi.org/10.3390/foods12122312>
- Milián, G., Martínez, M. M., Rondón, A. J., & Rodríguez, M. (2023). Use of microbial additives in apiculture. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 57. <https://cjscience.com/index.php/CJAS/article/view/1091>
- Milián, G., Samaniego, L.M.F., Pérez, M., Ascunce, G.S., Laurencio, M.S. & Espinosa, P.I. (2004). Hidrolizado enzimático de levadura de destilería de alcohol como componente de medio de cultivo en Microbiología. Patente solicitada No. 2004-0208
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N. K., & Zawawi, N. (2020). Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *Journal of*

*Apicultural Research*, 60(1), 172–187.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152>

Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agron. Mesoam.*, 30(2), 601-11.  
[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)

Motta, E. V. S. & Moran, N. A. (2023). The honeybee microbiota and its impact on health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 22, 122–137. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00990-3>

Motta, E. V. S., Powell, J. E., Leonard, S. P., & Moran, N. A. (2022). Prospects for probiotics in social bees. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 377, 20210156.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0156>

Nowak, A., Szczuka, D., Górczyńska, A., Motyl, I. y Kręgiel, D. (2021). Caracterización de la microbiota gastrointestinal y las bacterias del ácido láctico de *Apis mellifera* para la protección de las abejas melíferas: una revisión. *Cells*, 10(3), 701.  
<https://doi.org/10.3390/cells10030701>

Oana, K., Shimizu, K., Takada, T., Makino, H., Yamazaki, M., Katto, M., Ando, M., Kurakawa, T. & Oishi, K. (2023). Manipulating the growth environment through co-culture to enhance stress tolerance and viability of probiotic strains in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(12), e01502-23.  
<https://doi.org/10.1128/aem.01502-23>

Orłowski, A. & Bielecka, M. (2006). Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56 (3), 269–275. ISSN: 1230-0322. <https://journal.pan.olsztyn.pl/PRELIMINARY-CHARACTERISTICS-OF-LACTOBACILLUS-AND-BIFIDOBACTERIUM-STRAINS-AS-PROBIOTIC,97947,0,2.html>

Pacheco-Martínez, C. K., Saucedo-Castañeda, G., Rodríguez-Durán, L. V., & Pérez-Chabela, M. D. L. (2023). Characteristics of microorganisms used as probiotics and

new probiotics. *Actualidades Biológicas*, 45(119).  
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi/v45n119a05>

Pachla, A., Ptaczyńska, A. A., Wicha, M., Kunat, M., Wydrych, J., Oleńska, E. & Małek, W. (2021). Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of *Apis mellifera* L. derived from the polish apiary. *Saudi J. Biol. Sci.*, 28 (3): 1890–1899.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.040>

Pérez, A. La apicultura en Cuba y su situación actual. *Agroecología*, 12(1): 6773, 2017.  
<https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/58320/1/3303611125461-1-SM.pdf>.

Pérez, M. (2000). Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba

Pérez Cobo, I. & Fernández Somalo, P. (2014). Antecedentes. Situación actual de la Loque americana. Notificación. Sistemas de control de la enfermedad. Jornada de formación "Programa de vigilancia piloto sobre las pérdidas de colonias de abejas".  
[https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/ganaderia/temas/sanidad-animal-ehigiene-ganadera/sanidad-animal/formacion/abejas/pvp-2013-2014/4situacion\\_loque\\_americana\\_30714.pdf](https://www.mapa.gob.es/dam/mapa/contenido/ganaderia/temas/sanidad-animal-ehigiene-ganadera/sanidad-animal/formacion/abejas/pvp-2013-2014/4situacion_loque_americana_30714.pdf).

Pérez-Morfi, A. (2020). Influencia de la dieta en indicadores de capacidad de defensa de *Apis mellifera* africanizada a la nosemosis en condiciones tropicales. Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación Científica de Yucatán, 115. México. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1766>

Ramírez-Ahuja, M. L., Peña-Carrillo, K. L., Gómez-Govea, M. A., Jiménez-Martínez, M. L., Trujillo-Rodríguez, G. J., Espinoza-Ruiz, M., Guzmán Velasco, A., Flores, A. E., González-Rojas, J. I., Reséndez-Pérez, D., & Rodríguez-Sánchez, I. P. (2025). Gut Microbiota Diversity in 16 Stingless Bee Species (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Microorganisms*, 13(7), 1645.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms13071645>

Ramos, O. Y., Basualdo, M., Libonatti, C. & Vega, M. F. (2020). Estado actual y aplicación de bacterias lácticas en sistemas de producción animal con un enfoque en bacterias

de colonias de abejas melíferas. *Revista de microbiología aplicada*, 128(5), 1248–1260. <https://doi.org/10.1111/jam.14469>

Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J.M y Ellis, J. D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 116, 1792–1801. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1818371116>

Raymann, K. & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 26, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>

Robino, P., Galosi, L., Bellato, A., Vincenzetti, S., Gonella, E., Ferrocino, I., Serri, E., Biagini, L., Roncarati, A., Nebbia, P., Menzio, C., & Rossi, G. (2024). Effects of a supplemented diet containing 7 probiotic strains (Honeybeeotic) on honeybee physiology and immune response: analysis of hemolymph cytology, phenoloxidase activity, and gut microbiome. *Biological research*, 57(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00533-x>

Rodríguez, J. A., Hernández, J. E., Frizzo, S., Fernández, K., Sánchez, L., & Solenzal Valdivia, Y. (2021). Caracterización *in vitro* de propiedades probióticas de *Lactobacillus* ssp. aislados del tracto digestivo de abejas. *Revista de Salud Animal*, 43(2), <http://revista.censa.edu.cu/index.php/RSA/article/view/1162/1885>

Rodríguez, M.A., Fernández, L.A., Daisley, B.A., Reynaldi, F.J., Allen-Vercoe, E. & Thompson, G.J. (2023). Probiotics and in-hive fermentation as a source of beneficial microbes to support the gut microbial health of honey bees, *Journal of Insect Science*, 23(6). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iead093>

Rondón, A.J. (2009). Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. Cuba

- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1), S96-119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Royan, M. (2019). Mechanisms of Probiotic Action in the Honeybee. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 29(2), 95–103. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025358>
- Salamanca-Loyola, D.A. (2024). Efecto de bacterias lácticas para mejorar el sistema inmunológico en abejas (*Apis mellifera*) y reducir la carga del virus de las alas deformadas (DWV). Tesis presentada para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Concepción. Disponible en: <https://repositorio.udec.cl/handle/11594/5624>
- Sanabria, J. L., Rodríguez, T., Veliz, M. A., Llanes, J. R., Demedio, J., Lóriga, W., Álvarez, D. (2016). Parasitological diagnosis in honey bee in the territorial lab of imv of San José de las Lajas, Mayabeque. *Apiciencia*. XVIII (3), 35-46.
- Sánchez, Ó.J., Barragán, P J., & Serna, L. (2019). Review of *Lactobacillus* in the food industry and their culture media. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 63-76. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.81576>
- Schillinger, U., & Lucke, 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>
- Shah, A. B., Baiseitova, A., Zahoor, M., Ahmad, I., Ikram, M., Bakhsh, A., Al-Zharani, M. (2024). Probiotic significance of *Lactobacillus* strains: a comprehensive review on health impacts, research gaps, and future prospects. *Gut Microbes*, 16(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2431643>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Shehata, M. G., Masry, S. H. D., El Aziz, N. M. A., Ridouane, F. L., Mirza, S. B., & El-Sohaimy, S. A. (2024). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from

honeybees stomach: functional and technological insights. *Annals of Agriculture Sciences*, 69, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2024.06.001>

Sinekçi, Y., Afşaroğlu, E., Kabak, B., Sarıçayır, S., Soytemiz, I., & Ozdemir, G. (2024). Examination of intestinal microbiota abundance of honey bees supplemented and unsupplemented with probiotic bacteria by QPCR. *Scientific Reports*, 14(1), 28959. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77338-1>

Sionek, B., Szydłowska, A., Trzaskowska, M., & Kołozyn-Krajewska, D. (2024). The impact of physicochemical conditions on lactic acid bacteria survival in food products. *Fermentation*, 10, 298. <https://doi.org/10.3390/fermentation10060298>

Sosa Cossio, D., García Hernández, Y., & Dustet Mendoza, J. C. (2018). Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(4), 357-373. <http://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/836/868>

Sosa-Cossio, D., García-Hernández, Y., Dustet-Mendoza, J. C., Vázquez, M. A., Albelo-Dorta, N., & Ortega-de-la-Paz, D. (2025). Diseño de medios de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como probiótico para la producción animal. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 28(1): e2644. <http://doi.org/10.31910/rudca.v28.n1.2025.2644>

Statgraphic Technologies, Inc (2020). *Statgraphic Centurion* (version 19.1.1). Statgraphic Technologies, Inc. <https://www.statgraphic.com>

Stephan, J. G.; Lamei, S.; Pettis, J. S.; Riesbeck, K.; De Miranda, J. R. & Forsgren, E. (2019). Honeybee-specific lactic acid bacterium supplements have no effect on American Foulbrood-infected honeybee colonies. *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (13): e00606–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00606-19>

Stephen, J.M, & Saleh, A.M. (2023). Homofermentative *Lactobacilli* isolated from organic sources exhibit potential ability of lactic acid production. *Front Microbiol.* 14:1297036. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1297036>

- Szymaś, B., Łangowska, A., & Giejdasz K. (2007). Condition of the worker honeybees fed various carbohydrate syrups in laboratory conditions. *Nauka Przyroda. Technologie*, 1(2), 2-5.
- Teame, T., Anran, W., Mingxu, X., Zhen, Z., Yalin, Y., Qianwen, D., Chenchen, G., Erik, O., Chao, R., & Zhigang, Z. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>
- Tilocca, B., Greco, V., Piras, C., Ceniti, C., Paonessa, M., Musella, V., Bava, R., Palma, E., Morittu, V. M., Spina, A. A., Castagna, F., Urbani, A., Britti, D., & Roncada, P. (2024). The bee gut microbiota: Bridging infective agents potential in the one health context. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3739. <https://doi.org/10.3390/ijms25073739>
- Todorov, S. D., Alves, M. V., Bueno, G. C. A., Alves, V. F., & Ivanova, I. V. (2024). Bee-associated beneficial microbes-importance for bees and for humans. *Insects*, 15(6), 430. <https://doi.org/10.3390/insects15060430>
- Torres, M. (2018). Evaluación tecnológica del proceso de obtención de biomasa de microorganismos probióticos en medio de cultivo formulado con suero lácteo suplementado. Recovered from: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/69569>
- Truong, A. T., Kang, J. E. & Yoo, M. S. (2023). Probiotic candidates for controlling *Paenibacillus larvae*, a causative agent of american foulbrood disease in honey bee. *BMC Microbiol.* 23: 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02902-0>
- Urcan, A. C., Criste, A. D., Bobis, O., Cornea-Cipcigan, M., Giurgiu, A. I., & Dezmirean, D.S. (2024a). Evaluation of functional properties of some Lactic Acid Bacteria strains for probiotic applications in apiculture. *Microorganisms*, 12, 1249. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061249>
- Urcan, A. C., Criste, A. D., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Bonta, V., Burtescu, R. F., Olah, N.-K., Cornea-Cipcigan, M., & Mărgăoan, R. (2024b). Enhancing antioxidant and antimicrobial activities in bee-collected pollen through solid-state fermentation: A

- comparative analysis of bioactive compounds. *Antioxidants*, 13(3), 292. <https://doi.org/10.3390/antiox13030292>
- Vera, M., Sánchez, L., Zambrano, P y Rodríguez, Y. 2021. Obtención de un candidato a probiótico de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materias primas agroindustriales. *Rev. Salud. Anim.*, 43(3), e03. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253570X2021000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2021000300003)
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front Microbiol.* 10:57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>
- Vit, P., Pedro, S. R., Maza, F., Ramírez, V. M., & Frisone, V. (2018). Diversity of stingless bees in Ecuador, pot-pollen standards, and meliponiculture fostering a living museum Meliponini of the world. In *Pot-pollen in stingless bee melittology* (pp. 207-227). Cham: Springer International Publishing. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-61839-5\\_15](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-61839-5_15)
- Ye, M., Jiang, Y., Han, Q., Li, X., Meng, C., Ji, C., Ji, F., & Zhou, B. (2025). Probiotic potential of *Enterococcus lactis* GL3 strain isolated from honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Insights into its antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*. *Veterinary Sciences*, 12(2), 165. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020165>
- Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., & Suzuki, C. (2013). Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of invertebrate pathology*, 112(1), 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.09.00>
- Yousefi, B., Eslami, M., Ghasemian, A., Kokhaei, P., Salek Farrokhi, A., & Darabi, N. (2019). Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8008-8018. <https://doi.org/10.1002/jcp.27559>
- Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal

signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(18), 4775–4780. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114>

Zulkhairi Amin, F. A., Shafiq Cheng, M. Z., Sabri, S., Ismail, N., Chan, K. W., Mohd Esa, N., Mohd Lila, M. A., Nur-Fazila, S. H., Khalifa, S. A. M., El-Seedi, H. R., & Zawawi, N. (2023). *In Vivo* toxicity assessment of the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* HTI-19 isolated de stingless bee (*Heterotrigona itama*) Miel. *Nutrients*, 15(10), 2390. <https://doi.org/10.3390/nu15102390>

*Anexos*

## ANEXOS

## Anexo 1

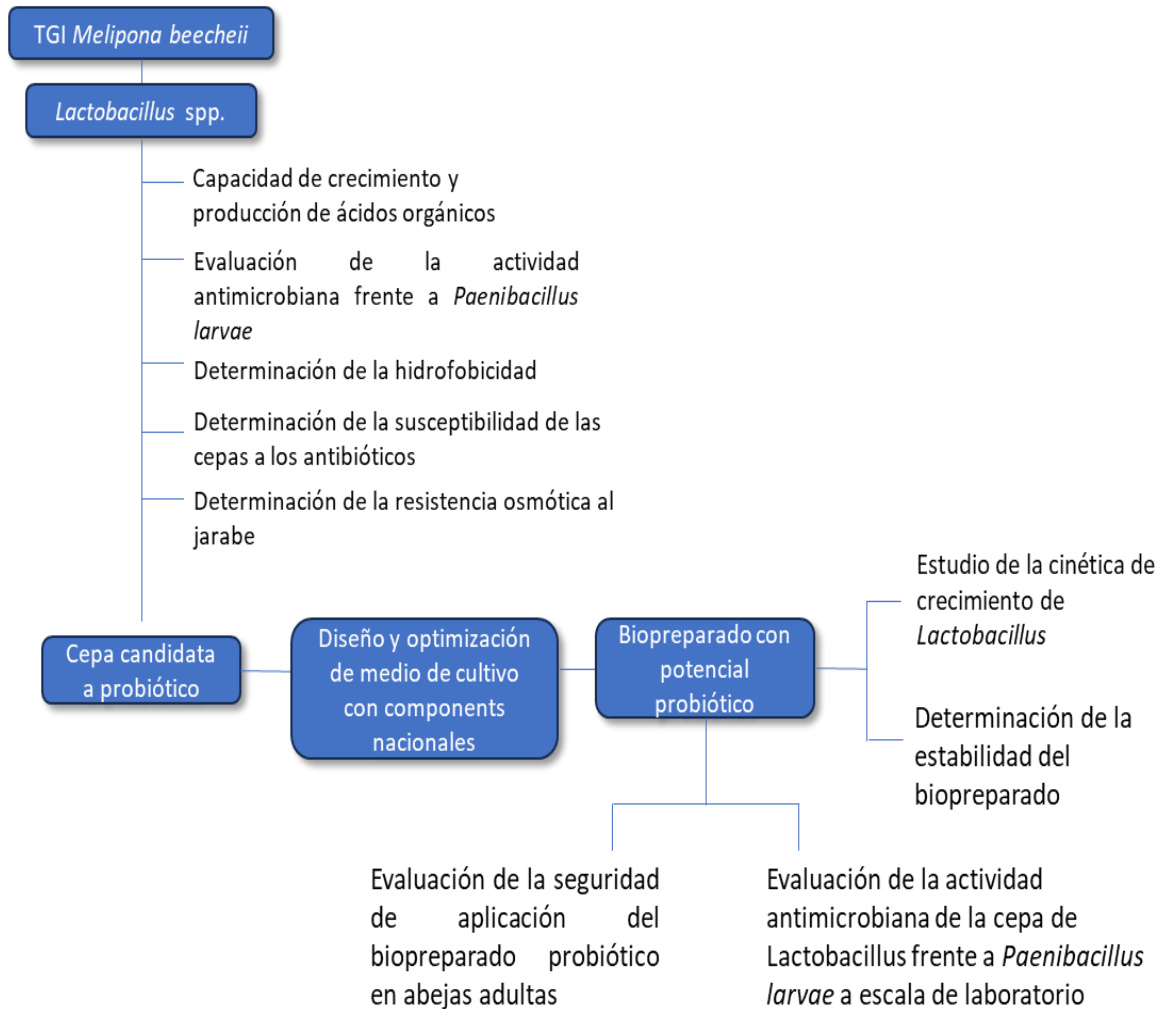


Figura 18. Metodología para la obtención de un biopreparado probiótico a partir de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii*.

## Anexo 2

Tabla 17. Análisis de varianza para la variable LN UFC.mL<sup>-1</sup>

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
A: X1	54,8165	1	54,8165	124,77	0,0000
B: X2	2,40381	1	2,40381	5,47	0,0250
C: X3	21,0971	1	21,0971	48,02	0,0000
AA	32,1533	1	32,1533	73,18	0,0000
AB	0,352837	1	0,352837	0,80	0,3761
AC	4,0262	1	4,0262	9,16	0,0045
BB	2,59291	1	2,59291	5,90	0,0202
BC	1,93234	1	1,93234	4,40	0,0431
CC	53,3284	1	57,3284	130,49	0,0000
Bloques	0,581067	2	0,290533	0,66	0,5223
Total error	15,8165	36	0,439348		

Total (corr.)            172,974            47

R<sup>2</sup>= 90,8561

R<sup>2</sup> (ajustado) = 88,6905

Error estándar de la estimación = 0,662834

Error absoluto medio = 0,471399