



Original

Propiedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii*

In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. from the digestive tract of *Melipona beecheii*

Marlene María Martínez Mora *, Ana Julia Rondón Castillo *, Arley Pérez Rojas **, Elizabeth Cepero Pereira *

*Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, Km 3 ½, Matanzas, Cuba.

**Universidad de Ciencias Médicas de Matanzas, Carretera Central Km 101, Matanzas Cuba.

Correspondencia: marlenemar07@gmail.com

Recibido: Marzo, 2025; Aceptado: Marzo, 2025; Publicado: Junio, 2025.

RESUMEN

Objetivo. Seleccionar cepas de *Lactobacillus* spp. con propiedades probióticas procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii*. **Materiales y métodos:** Se determinaron *in vitro* las propiedades probióticas de cada una de las cepas a partir de los ensayos siguientes: capacidad de crecimiento, producción de ácidos orgánicos, actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae*, susceptibilidad antimicrobiana, hidrofobicidad y resistencia osmótica al jarabe. **Resultados:** Se aislaron 13 cepas con características distintivas del género *Lactobacillus*. En el estudio de capacidad de crecimiento, las mejores cepas con concentración celular ≥ 9 Log UFC mL⁻¹ fueron L6, L34, L42, L31 y L32. En cuanto a la producción de ácidos orgánicos, sobresalió la cepa L13 con respecto al control. Todas tuvieron actividad antimicrobiana frente al patógeno *P. larvae*, donde L31 formó los mayores halos con 43,33 mm. La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas frente a 13 antibióticos mostró un patrón de resistencia a kanamicina y sensibilidad a los restantes antibióticos. La prueba de hidrofobicidad con xileno y tolueno como solventes orgánicos arrojó que todas las cepas a excepción de la L34 presentaron clasificación alta. Se evaluó la resistencia osmótica al jarabe de las cepas, y solo se observó crecimiento en la concentración 1000g/L, donde L31 fue superior en cuanto a viabilidad. **Conclusiones:** La cepa con mejor potencial probiótico *in vitro* fue L31.

Palabras claves: abejas sin aguijón, microbiota, probióticos (Fuente: AGROVOC)

Como citar (APA) Martínez Mora, M. M., Rondón Castillo, A. J., Pérez Rojas, A., & Cepero Pereira, E. (2025). Propiedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. procedentes del tracto digestivo de *Melipona beecheii*. *Revista De Producción Animal*, 37. <https://apm.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e173>



©El (los) autor (es), Revista de Producción Animal 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), asumida por las colecciones de revistas científicas de acceso abierto, según lo recomendado por la Declaración de Budapest, la que puede consultarse en: Budapest Open Access Initiative's definition of Open Access.

ABSTRACT

Aim. The present study aimed to select *Lactobacillus* spp. strains with probiotic properties from the digestive tract of *Melipona beecheii*. **Materials and methods:** The probiotic properties of each of the strains were determined *in vitro* from the following tests: growth capacity, organic acid production, antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae*, antimicrobial susceptibility, hydrophobicity and osmotic resistance to syrup. **Results:** Thirteen strains with distinctive characteristics of the *Lactobacillus* genus were isolated. In the growth capacity study, the best strains with cell concentration ≥ 9 Log CFU. mL⁻¹ were L6, L34, L42, L31, and L32. Regarding organic acid production, strain L13 stood out compared to the control. All strains had antimicrobial activity against the pathogen *P. larvae*, where L31 formed the largest halos with 43,33 mm. The antimicrobial susceptibility of the strains to 13 antibiotics showed a pattern of resistance to kanamycin and sensitivity to the remaining antibiotics. The hydrophobicity test with xylene and toluene as organic solvents showed that all strains except L34 presented high classification. The strains' osmotic resistance to syrup was evaluated and growth was only observed at a concentration of 1000 µg/L, where L31 was superior in terms of viability. **Conclusions:** The strain with the greatest probiotic potential *in vitro* was L31.

Keywords: stingless bees, microbiota, probiotics (Source: AGROVOC)

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 silvestre 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 (El-Didamony *et al.*, 2024).

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 varoosis, la Loque americana, la nosemosis, e infecciones provocadas por diferentes virus ARN, entre otras (Arredondo *et al.*, 2018; Daisley *et al.*, 2020).

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. Estos

aditivos zootécnicos 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 (Milián *et al.*, 2023).

Las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) se conocen en Cuba como "abejas de la tierra". La especie *Melipona beecheii* B. constituye el ganado meliponícola del país (Lóriga *et al.*, 2015), y a diferencia de *Apis mellifera*, es más resistente a las infecciones debido a la combinación de varios factores entre los que destaca su estilo de vida y la presencia de una microbiota intestinal estable compuesta principalmente por bacterias de las familias *Lactobacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Acetobacteraceae* y *Streptococcaceae*. Estos simbioses son adquiridos del ambiente fundamentalmente y tienen funciones específicas dentro del hospedero (Cerqueira *et al.*, 2024).

Esta especie representa un reservorio inexplorado de microorganismos con potencial biotecnológico, debido a la poca información existente sobre la microbiota de su tracto digestivo. De ahí que esta investigación tuvo como objetivo, seleccionar *in vitro* cepas de *Lactobacillus* spp. con propiedades probióticas a partir del tracto digestivo de *M. beecheii*, como alternativa para el tratamiento y la prevención de enfermedades en *A. mellifera*.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Las muestras fueron tomadas en 5 apiarios de la Empresa Apícola de Matanzas y se colectaron en cada uno entre 10-20 abejas adultas vivas, provenientes de colmenas sanas. Para el aislamiento de las bacterias se siguió el protocolo descrito por Cerqueira *et al.* (2024). Las abejas de cada uno de los lotes fueron previamente desinfectadas (solución clorada al 1%) y lavadas 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 Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Alemania) para el crecimiento de *Lactobacillus* spp. Luego se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia (adición de doble capa de agar). Posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias con morfología diferente. 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, tinción de Gram y la realización de pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa). Se seleccionaron para el estudio las que cumplían con las características presuntivas del género *Lactobacillus* (Mathialagan *et al.*, 2018).

Determinación del potencial probiótico *in vitro* de los aislados

Capacidad de crecimiento y producción de ácidos orgánicos

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 a partir de este medio hasta obtener una turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala McFarland ($DO_{600} = 0,132; 1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) y se inocularon a razón de 1:10 (v/v) en frascos con 50 mL del mismo medio. 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. 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 $\geq 9 \text{ Log UFC. mL}^{-1}$.

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 está 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^{-1} (AOAC, 2023). Cada ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento. Se seleccionaron las mejores cepas productoras de ácidos orgánicos.

Actividad antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae*

En este ensayo, se empleó el método de difusión de sustancias en agar propuesto por Schillinger y Lucke (1989). Como cepa indicadora se utilizó *P. larvae* (cultivada en caldo J) procedente del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spiritus, Cuba (LARISA), la cual se enfrentó a los metabolitos producidos por cada uno de los aislados en estudio en caldo MRS. Se tomó como criterio de selección aquellos aislados que provocaron los mayores halos de inhibición.

Los resultados de estos tres ensayos, se utilizaron como criterios preliminares para seleccionar las mejores cepas que continuaron a estudios posteriores.

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 con los solventes orgánicos. 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.

Susceptibilidad antimicrobiana

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) (30 µg), eritromicina (E) (15 µg), cefepine (FEP) (30 µg), kanamicina (K) (30 µg), oxacillin (OX) (1 µg), penicilina G (P) (10 IU), piperacillin (PRL) (100 µg), y tetraciclina (TE). A las 48 h de incubación, se midieron los halos de inhibición. Cada análisis se realizó por triplicado. Se tomó como criterio de selección las cepas que mostraron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos probados.

Resistencia osmótica al jarabe

Se prepararon suspensiones de los aislamientos obtenidos en PBS, a partir de cultivos en caldo MRS a 37°C durante 24 h. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 4 de la escala Mc Farland ($DO_{600} = 0,669$; 10^9 UFC.mL⁻¹). Paralelamente, se preparó un jarabe en concentraciones de 1000 o 2000 g de azúcar por litro de agua (1:1 y 2:1 respectivamente), utilizado 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 1×10^5 UFC.mL⁻¹ y se incubaron a 37°C durante 72 h. El número de células bacterianas viables en cada tratamiento se determinó por recuento en placa en agar MRS a las 0 y 72 h. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia (Arredondo, 2015). Se tomó como criterio de selección definitivo para este estudio aquellas candidatas a probióticos que mantuvieron la viabilidad después de las 72 h.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico *Statgraphics Centurion 19.1.1* sobre Windows. Se determinó el ajuste de los datos a una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk W y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Levene modificado para todos los ensayos excepto para la hidrofobicidad. En ese caso se empleó el ajuste de bondad de Anderson-Darling para verificar que la muestra proviene de una distribución normal. Se realizó un análisis de varianza simple para determinar la presencia de diferencias significativas entre las cepas con respecto a los criterios de selección evaluados. Para el contraste de las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD con $p < 0,01$. Los datos se muestran como la media $\pm$ de la desviación estándar.

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.

Este artículo constituye el primer reporte en Cuba sobre el aislamiento de microorganismos con propiedades probióticas a partir del tracto digestivo de *M. beecheii* B.

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-Roblero *et al.*, 2020; Mohammad *et al.*, 2020).

A partir de los análisis estadísticos realizados se aceptó la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos (hipótesis nula), ya que el p-valor fue superior a 0,01.

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⁻¹ de las cuales L6, L34, L42, L31 y L32 obtuvieron los mejores resultados sin diferencias significativas entre ellas (p<0,01).

Una propiedad que debe caracterizar a los probióticos es la alta tasa de crecimiento, ya que los mismos deben aplicarse en cantidades suficientes para llegar al 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 verifica la capacidad que tienen todos los aislados de excretar estas sustancias con efecto antimicrobiano. La cepa L13 alcanzó el mayor valor con respecto al control con 16,93 g.L⁻¹. El menor valor observado fue para L32 con 9,58 g. L⁻¹.

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

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas 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 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. La disminución del pH que se produce en esta cavidad acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Rodríguez *et al.*, 2021).

Todas las cepas tuvieron actividad antimicrobiana frente al *P. larvae*. Los valores más elevados correspondieron a L31 con 43,33 mm, sin embargo, esta cepa no mostró diferencias significativas con los diámetros de inhibición detectados para L6, L24, L42, L13, L34 y L36 (Tabla 1).

Estos resultados son superiores a los detectados 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*.

Daisley *et al.* (2020) 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.

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* de abejas melíferas adultas. Estos resultados sugieren que la mezcla probiótica puede 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 continuaron 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.

Los datos obtenidos en esta investigación en cuanto al xileno son superiores 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 son inferiores 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.

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

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

Letras distintas indican diferencias significativas 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. Clasificación: Alta (51-100%), Media (30-50%) y Baja (0-29%).

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 el sistema inmunológico, por lo que un criterio a tener en cuenta en su selección es conocer 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 ha descrito que las bacterias lácticas presentan resistencia a la amikacina, oxacillina y vancomicina y 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).

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 este caso, las cepas fueron resistentes a la ampicilina, la vancomicina y la kanamicina, resultado que concuerda con este estudio solo para el último antibiótico. Existe similitud en cuanto a sensibilidad para el cloranfenicol.

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

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

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

S: Susceptible, R: Resistente.

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. Por ambos motivos es importante que los microorganismos a emplear en el diseño de productos en base a probióticos para abejas, tengan la capacidad de sobrevivir en estas condiciones, pues ellos son introducidos en el alimento.

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

Este reporte supera al informado por Audisio y Benitez-Ahrendts (2011) quienes evaluaron la supervivencia de una cepa de *L. johonsonii* a concentraciones de azúcar de 125g/L, 250g/L y 500g/L. Estos autores observaron que la cepa no perdía viabilidad a las 24h al ser incubada en 125 g de azúcar/L, mientras que, en mayores concentraciones de azúcar no había crecimiento (500 g/L) o se veía muy disminuido (250g/L).

Tabla 4. Resistencia osmótica al jarabe por *Lactobacillus* spp.

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

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas según prueba de rangos múltiples de Tukey HSD ($p < 0,01$). Las cepas marcadas con (*) se consideran las de mejor desempeño.

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

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 L31 pudiera estar asociada a la acumulación de solutos compatibles (osmoprotectores) en su citoplasma. Entre ellos encontramos el glicerol, la trehalosa, glicina betaína, prolina, glutamato, azúcares y polioles. Estos compuestos retienen agua en la célula, manteniendo 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).

En medio de la crisis sanitaria apícola actual, el uso de probióticos tiene gran potencial para mejorar la salud y resistencia a las enfermedades de estos insectos. Sin embargo, es fundamental ser cauteloso al aplicar microorganismos que no sean especies nativas. Se deben realizar estudios exhaustivos para evaluar su eficacia, seguridad e impacto en el ecosistema antes de usarlos a gran escala.

CONCLUSIONES

El tracto digestivo de *M. beecheii* constituye un reservorio de bacterias del género *Lactobacillus* con propiedades probióticas *in vitro*. En este estudio, la cepa L31 fue la que mostró las mejores potencialidades. Este microorganismo pudiera utilizarse en la elaboración de un biopreparado probiótico que mejore la salud y la productividad de *A. mellifera*.

REFERENCIAS

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. (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>
- 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>
- 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>
- 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. (2020). 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Harrigan, W. F., & McCance, M. E. (1966). Métodos de laboratorio de Microbiología. Editorial Academia.
- 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=S086403942021000100014&lng=es&tlng=pt
- 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>
- 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, 1567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081567>
- 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>
- 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>
- 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>
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 6463-6472. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09978-7>
- 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>

- 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>
- 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.aoas.2024.06.001>
- Sionek, B., Szydłowska, A., Trzaskowska, M., & Kołożyn-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>

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Concepción y diseño de la investigación: MMMM; análisis e interpretación de los datos: AJRC; redacción del artículo: APR, ECP.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.