

Caracterización *in vitro* de propiedades probióticas de *Lactobacillus* ssp. aislados del tracto digestivo de abejas



In vitro characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* ssp. isolated from the digestive tract of bees <https://eqrcode.co/a/jZ4PZq>

✉ José Antonio Rodríguez Díaz^{1*}, ✉ Juan Emilio Hernández García², Laureano Sebastián Frizzo³,
✉ Ken Jact Fernández León¹, ✉ Lilian Sánchez⁴, ✉ Yovanni Solenzal Valdía¹

¹Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA). Sancti Spiritus. Cuba.

²Departamento de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Sancti Spiritus "José Martí Pérez". Cuba.

³Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. UNL-FCV. Argentina.

⁴Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar *in vitro* bacterias ácido lácticas (*Fructobacillus fructosus* SS66, *Lactococcus garvieae* SS79, *Fructobacillus fructosus* SS72, *Lactobacillus kunkeei* SS70, *Lactobacillus rhamnosus* SS73), aisladas del tracto digestivo de abejas *Apis mellifera*. Se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas enzimáticas, estabilidad de crecimiento a diferentes temperaturas (37 y 45°C) y a un rango de pH (3,5; 4,5; 5,5; 6,5), tolerancia a jugo gástrico artificial (JGA), sales biliares (0,3, 05 y 1 %); pruebas de adherencia como agregación, autoagregación e hidrofobicidad y antagonismo microbiano. Los resultados mostraron que todas las cepas crecieron a 37°C a pH ácido 6,5 y 5,5; no crecieron a pH 4,5, produjeron peróxido de hidrógeno y no revelaron actividad hemolítica. Las cepas soportaron el JGA pH 3 durante 3 h a 37°C y a las sales biliares hasta 1 %. Ninguna cepa mostró poder de autoagregación y solo dos (*L. rhamnosus* SS73 y *L. kunkeei* SS70) produjeron coagregación contra *Escherichia coli*. La hidrofobicidad fue variable entre las cepas, *F. fructosus* SS72 exhibió un valor alto, *L. rhamnosus* SS73 y *L. kunkeei* SS70 medio y *L. garvieae* SS79 y *F. fructosus* SS66 bajo. Todas las cepas presentaron amplio espectro de actividad antimicrobiana y efecto inhibitorio frente a *Paenibacillus larvae* y otros patógenos humanos y animales. Las cepas que mejor comportamiento mostraron corresponden a *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73; fueron susceptibles a los agentes antimicrobianos utilizados con excepción de la Sulfonamida y Vancomicina y, a partir de estos resultados, se podrán incorporar en un inóculo probiótico para evaluar su efecto *in vivo*.

Palabras clave: probióticos, *Apis mellifera*, *Lactobacillus* ssp, microbiota en abejas, *L. rhamnosus*, *L. kunkeei*.

ABSTRACT: The present work aimed at characterizing *in vitro* the lactic acid bacteria *Fructobacillus fructosus* SS66, *Lactococcus garvieae* SS79, *Fructobacillus fructosus* SS72, *Lactobacillus kunkeei* SS70, *Lactobacillus rhamnosus* SS73, isolated from the digestive tract of bees *Apis mellifera*. Their probiotic capacity was evaluated by enzymatic tests, growth stability at different temperatures (37 and 45°C) at a range of pH (3.5; 4.5; 5.5; 5.5; 6.5), tolerance to artificial gastric juice (AGJ), bile salts (0.3, 05 and 1 %), and adhesion tests such as aggregation, self-aggregation and hydrophobicity and microbial antagonism. The results showed that all strains grew at 37°C at acidic pH 6.5 and 5.5 and did not grow at pH 4.5; they produced hydrogen peroxide and did not reveal hemolytic activity. The strains tolerated AGJ pH 3 for 3 h at 37 °C and bile salts up to 1%. No strain showed self-aggregation and only two (*L. rhamnosus* SS73 and *L. kunkeei* SS70) produced co-aggregation against *Escherichia coli*. Hydrophobicity was variable among the strains, *F. fructosus* SS72 exhibiting a high value, *L. rhamnosus* SS73 and *L. kunkeei* SS70 a medium value and *L. garvieae* SS79 and *F. fructosus* SS66 a low one. All strains showed a broad spectrum of antimicrobial activity and inhibitory effect against *Paenibacillus larvae* and other human and animal pathogens. The best-performing strains were *L. kunkeei* SS70 and *L. rhamnosus* SS73, which were susceptible to the antimicrobial agents used, with the exception of Sulfonamide and Vancomycin. From these results, they can be incorporated into a probiotic inoculum to evaluate their effect *in vivo*.

Key words: probiotics, *Apis mellifera*, *Lactobacillus* ssp, microbiota in bees, *L. rhamnosus*, *L. kunkeei*.

INTRODUCCIÓN

Son conocidas las consecuencias negativas de los residuos de antibióticos y químicos en los alimentos, por lo que constituyen una gran preocupación y amenaza para la salud humana en todo el planeta (1);

una alternativa ante tal situación sería evitar el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento o profilácticos de rutina en los animales (2) y, como estrategia, incluir prácticas mejoradas de manejo, uso de probióticos y otros productos naturales que aumenten la capacidad del sistema inmune y la salud de los animales (3) y, en especial, las abejas (4, 5).

*Autor para la correspondencia: José Antonio Rodríguez Díaz. E-mail: diagnostico@larisaulcsa.minag.gob.cu

Recibido: 08/04/2021

Aceptado: 09/08/2021

Actualmente se acepta que las abejas tienen una microbiota intestinal específica, que se vuelve estable al llegar a la etapa adulta (6, 7). El conocimiento sobre su composición y diversidad de funciones (8), así como el vínculo entre una microbiota intestinal equilibrada y el estado de salud del insecto, potencian el uso de cepas probióticas y otros aditivos naturales con tales fines (9, 10); por consiguiente, aislar microorganismos propios del insecto favorece su utilización como probióticos, debido a que estos tienen un gran potencial de exclusión competitiva contra patógenos, ya que existe una mayor adaptación y afinidad por el mismo nicho ecológico (11).

Los probióticos son definidos como "microorganismos que, administrados vivos y en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped" (12). Sin embargo, en el campo de la nutrición y salud animal, especialmente para los animales de granja donde se incluyen las abejas, los probióticos pueden proteger al animal contra bacterias patógenas específicas o tener efectos beneficiosos sobre el rendimiento animal (13).

Los probióticos, que generalmente se utilizan, son bacterias acidolácticas y corresponden a los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y especies de hongos anaerobios como *Saccharomyces* y *Aspergillus* (14); muchas de estas especies son habitantes importantes del tracto intestinal del hombre y los animales y son generalmente reconocidas como seguras (por sus siglas en inglés, GRAS, *Generally recognized as safe*) (15).

El uso de probióticos está bien establecido desde hace décadas, tanto en humanos como en animales de producción, principalmente con el uso de bacterias lácticas y levaduras. La introducción al sector apícola en los últimos años se incrementó, y se reporta que potencian el sistema inmune, disminuyen el número de microorganismos patógenos y mejoran las tasas de crecimiento (16).

Son varios los mecanismos de acción de los probióticos (17), pero los efectos solo pueden ser atribuidos con especificidad a las cepas analizadas en cada estudio, y no se pueden generalizar a todas las especies ni a todo el grupo de cepas probióticas (18) y se deben seguir diferentes protocolos de seguridad (19). El hecho de que los efectos son específicos para cada cepa, implica que se deben registrar los resultados sanitarios apoyados en los estudios *in vitro*.

Estos microorganismos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo y para ello tienen que resistir la acción de los jugos gástricos y la bilis; además, tener capacidad de colonizar y proliferar en este medio (20). Desde esas perspectivas, se evaluaron diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) y se incorporaron en el alimento de las abejas (21, 22). Por lo que

el objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante pruebas *in vitro* el potencial probiótico de cepas BAL del tracto digestivo de abejas *Apis mellifera*, previamente aisladas e identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se emplearon las siguientes cepas BAL (*Fructobacillus fructosus* SS66, *Lactococcus garvieae* SS79, *Fructobacillus fructosus* SS72, *Lactobacillus kunkeei* SS70, *Lactobacillus rhamnosus* SS73), aisladas previamente del tracto digestivo de abejas adultas (*Apis mellifera*) (23) y mantenidas en el cepario del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA) y el Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Sancti Spiritus "José Martí Pérez", provincia Sancti Spiritus, Cuba. Las cepas fueron sometidas a diferentes ensayos *in vitro* (20) para evaluar y seleccionar aquellas que pudieran ser las mejores candidatas para ser utilizadas como probióticas en la alimentación de las abejas. Los ensayos se describen a continuación.

Crecimiento a diferentes temperaturas

Se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL de capacidad, con 9 mL del medio De Man, Rogosa and Sharpe (MRS), a pH 6,5 a los que se le inoculó un cultivo fresco de 16 h (10 % del volumen final) y se incubaron a diferentes temperaturas (37 y 45°C) durante 24 h, se observó el crecimiento mediante cambios de turbidez en el medio de cultivo. Se utilizaron los siguientes criterios: Ausencia de crecimiento (-); Crecimiento muy débil (+); Crecimiento débil (++); Crecimiento abundante (+++).

Cinética de crecimiento a diferentes pH

Se prepararon tubos Falcon™ de 20 mL de capacidad con 10 mL de medio caldo MRS; se ajustó el pH con ácido fosfórico a 6,5; 5,5; 4,5 y 3,5. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave (VK-75-01, Rusia) a 121°C durante 15 min. El ensayo de la cinética de crecimiento se realizó en microplacas de 96 pocillos (Costar 3599, Corning, EUA). Para esto, se depositaron en cada pocillo 240 µL de los medios y 30 µL de inóculo de un cultivo de 18 h de cada cepa en estudio. El crecimiento microbiano se realizó a 37°C durante 24 h, bajo condiciones aeróbicas en incubadora (Binder, Alemania). Las lecturas de la absorbancia se realizaron cada 30 min a 630 nm mediante el lector multimodal de microplacas Sinergy HT BioTEK (BioTEK Instrumentos-EUA). Los medios no inoculados se utilizaron como controles. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Hidrólisis de la caseína de la leche (proteólisis)

Para examinar la actividad proteolítica se siguió la metodología descrita por Harrigan (24), con algunas modificaciones. Se prepararon dos medios de cultivo: 1) agar leche descremada que consistió en leche en polvo descremada (Loba Chemie PVT.LTD, India) al 5 % y agar (Britania, Argentina) al 1,3 %; medio 2) agar-leche descremada al 2 % en agua de peptona y agar a una concentración de 1,3 %; ambos medios se ajustaron a pH 6,5; se esterizaron por separado la leche y el medio peptonado, se dejaron enfriar a 60°C y luego se mezclaron y repartieron en placas Petri. Se prepararon placas con perforaciones de 6 mm de diámetro, que se rellenaron con 20 µL de los cultivos de las cepas BAL en estudio, y placas sin perforaciones que se sembraron por estrías. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias y en las perforaciones se consideró como reacción positiva de proteólisis de la caseína. El ensayo se realizó por triplicado y en dos momentos diferentes.

Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La capacidad de las cepas para producir H₂O₂ se determinó según la metodología descrita por McLean y Rosentein (25). Los cultivos bacterianos se sembraron en duplicado por estría sobre agar MRS suplementado con 2,5 mg/mL de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y 0,01 mg/mL de Peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. En presencia de H₂O₂, la enzima HRP oxida al TMB (incoloro) para dar lugar a la formación de un pigmento azul. La tonalidad de la coloración azul se consideró una medida semicuantitativa de la cantidad de H₂O₂ producido y liberado al medio por la cepa (16). La intensidad de la coloración azul fue incluida dentro de una de las siguientes categorías: azul claro o azul oscuro y, por la rapidez en la aparición, en Rápido (+++), Intermedio (++) , Lento (+) y Negativo (-).

Prueba de coagulación

La capacidad de coagulación de las cepas BAL se determinó según la metodología descrita por Hernández-García *et al.* (26); se utilizó leche descremada en polvo (LDP) con una concentración final de sólidos de 12,5 % p/v. Posteriormente se dispensó en tubos de ensayos de 15 mL de capacidad, a razón de 9 mL, los cuales fueron esterilizados en vapor fluyente durante 20 min. Después de enfriar a 45°C, se le añadió 1 mL (10 % vol final) del inóculo inicial (crecido de 16-18 h en MRS, pH 6,5). Los tubos se incubaron a 37°C durante 12 h. La coagulación de la leche se consideró

positiva cuando apareció la presencia de un coágulo adherido al fondo del tubo que no se desplazaba al invertir el mismo. Se utilizó *Lactobacillus acidophilus* como cepa indicadora (control positivo).

Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de las cepas BAL se realizó sobre el medio Agar Columbia con 5 % de sangre de caballo (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia), pH 6,5, según el método estándar con ligeras modificaciones descrito por Balamurugan *et al.* (27). La incubación se realizó a 37°C por 48 h en aerobiosis. Las cepas fueron evaluadas según la zona de hemólisis alrededor de la colonia, como positivas o negativas y de acuerdo al tipo de hemólisis: β-hemólisis, cuando apareció una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia, α-hemólisis, una zona verde alrededor de la colonia y gamma (γ) si la zona alrededor de la colonia no era clara. Se utilizó como control positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Descarboxilación de aminoácidos

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas BAL se realizó mediante un método cualitativo descrito por Mete *et al.* (28), que consistió en un medio líquido base con la siguiente composición: Peptona de caseína 0,5 %, Extracto de levadura 0,3 %, D (+) Glucosa 0,1 %, Púrpura de bromocresol 0,0016 % (Mallinckrodt Baker, Inc, EUA). A 0,9 % del medio de cultivo base se le agregó 0,5 % del aminoácido a testar: L Arginina, L Histidina, L Lisina, L Tirosina y L Triptófano (Biopack, Argentina). Luego se ajustó el pH del medio a 6,7±0,1 a 25°C. Los tubos duplicados se inocularon con 10 µL de cultivo y se incubaron 72 h a 37°C. El color del medio al momento de la siembra era de color púrpura. El medio inicialmente pasa a amarillo al acidificarse y retorna a púrpura si la cepa descarboxila los aminoácidos; el pH del medio de cultivo aumenta. Prueba positiva: color del medio púrpura, la cepa es productora de aminas biógenas. Prueba negativa: color del medio amarillo, la cepa no produce aminas biógenas con el aminoácido probado.

Crecimiento en bilis

La tolerancia a sales biliares se llevó a cabo de acuerdo con la metodología utilizada por Uriot *et al.* (29), en microplacas de 96 pocillos. Las cepas se multiplicaron en caldo MRS en presencia de 0,3 %, 0,5 % y 1 % de bilis bovina (Britania, Argentina); se adicionaron 240 µL en cada pocillo y 30 µL del cultivo de 18 h de las cepas en estudio. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h y las lecturas de absorbancia se realizaron cada 30 min a 630 nm mediante el Lector multimodal de microplacas Sinergy HT BioTEK (Bio-TEK Instrumentos-EUA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tolerancia a jugo gástrico artificial (JGA)

El ensayo de tolerancia al jugo gástrico se realizó con ajustes a la metodología descrita por Bao *et al.* (30). El JGA consistió en una solución de pepsina (Riedel-deHaën, Alemania) (0,35 % p/v) y NaCl (Emsure®, Dinamarca) (0,2 % p/v); una mitad (50 %) ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico y la otra restante a pH 6,5. La esterilización se realizó por filtración (0,22 µM). Las suspensiones de JGA se inocularon a 1 % con cultivos de 18 h de cada una de las cepas BAL y mezclados durante 10 s. El JGA con pH 3 se incubó durante 3 h a 37°C. Posteriormente se evaluó la cinética de crecimiento de cada cepa en microplacas de 96 pocillos. Para esto, se depositaron en cada pocillo 240 µL del medio MRS, pH 7 y transferido 30 µL de inóculo de JGA (JGA con pH 3 durante 3 h a 37°C) de cada cepa en estudio. El crecimiento microbiano se realizó a 37°C durante 24 h. Las lecturas de absorbancia se realizaron cada 30 min a 630 nm mediante el Lector multimodal de microplacas Sinergy HT BioTEK (BioTEK Instrumentos EUA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron como controles los medios no inoculados.

Prueba de agregación

Se realizó el ensayo de agregación de acuerdo a la técnica utilizada por Reniero *et al.* y Maldonado *et al.* (31, 32). Los cultivos, incubados 18 h a 37°C en MRS, se centrifugaron y se lavaron tres veces con agua destilada y se resuspendieron en el volumen inicial con una solución de Ringer- lactato y se llevaron a una DO de 0,7. Los sobrenadantes de cada una de las cepas se filtraron y se agregaron a la suspensión a una concentración final del 10 % (v/v). Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente. La agregación se considera positiva cuando las partículas visibles, similares a la arena y formadas por las células agregadas, se depositan en el fondo del tubo y dejan el sobrenadante limpio en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente.

Coagregación con patógenos intestinales

El ensayo de coagregación se basó en métodos reportados por Maldonado *et al.* y Reid (32, 33). Las suspensiones de microorganismos ajustaron a una densidad óptica de 0,7 en PBS. Una alícuota de 500 µL de los cultivos de las cepas seleccionadas de *Lactobacillus* ssp. se centrifugaron, filtraron y mezclaron con la 500 µL de *Escherichia coli* y *Salmonella entérica serotipo Dublin*; las suspensiones se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Las suspensiones se observaron macroscópicamente y bajo microscopio óptico (con un lente de 100 X). La prueba se consideró positiva cuando se hizo visible la sedimentación de

las células sobre el fondo del tubo en un periodo máximo de 2 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron controles con suspensiones en PBS de las BAL y los patógenos utilizados.

Hidrofobicidad de la superficie celular

Para evaluar la hidrofobicidad en la superficie bacteriana, se realizó un ensayo según las indicaciones reportados por Frizzo *et al.* (34), para determinar, a través de porcentajes de hidrofobicidad, la tendencia a la adhesión epitelial (mayor porcentaje de hidrofobicidad, mayor adherencia). Cada una de estas cepas crecidas de cultivo fresco en caldo MRS a 37°C se lavaron con solución tampón fosfato salino (PBS), se ajustaron a una densidad óptica de 0,6-0,7 a 560 nm (DO_{560nm}) y se mezclaron con la misma cantidad de n-hexadecano a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min, se midió la DO_{560nm} de la fase acuosa. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó mediante la siguiente ecuación.

La actividad de hidrofobicidad de las cepas evaluadas se clasificó como alta (51-100 %), media (30-50 %) y baja (0-29 %), según lo propuesto por Nader-Macías *et al.* (35).

Prueba de Antagonismo microbiano frente a patógenos

La capacidad de las BAL evaluadas para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos patógenos se valoró mediante el método denominado "mota en césped" (36, 37). Se emplearon como indicadoras las siguientes cepas patógenas del cepario de Laboratorio de Alimentos del Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina: *Salmonella enterica serotipo Dublin* 595, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 289, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*; y también se enfrentaron a uno de los patógenos más importantes de las abejas, *Paenibacillus larvae*, del cepario del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spiritus, Cuba.

Las cepas BAL se multiplicaron en caldo MRS por 18 a 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se transfirieron 10 µL del cultivo de cada cepa a tres pocillos en una placa de agar MRS. Las placas fueron dispuestas bajo flujo laminar durante 30 min para permitir la absorción del cultivo y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h en jarra de anaerobiosis. Simultáneamente, se prepararon los cultivos de cada uno de los microorganismos indicadores, inoculando 3-4 colonias en 50 mL de caldo BHI (por sus siglas en inglés, Brain Heart Infusion, Merck, EUA) e incubados 12 a 16 h.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento a diferentes temperaturas

Al completarse el tiempo de incubación, se observaron las motas de BAL en la superficie de las placas, se vertieron 7 mL de agar BHI semisólido al 0,7 %, atemperado a 40°C sobre las placas de MRS y suplementado a 1 % con el cultivo líquido de cada uno de los microorganismos indicadores. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. En las placas se observaron la presencia o ausencia de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano. La inhibición se evaluó por medición del diámetro (mm) de la zona clara alrededor de las colonias de las cepas patógenas, con una regla graduada (38).

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de las cepas seleccionadas

A las cepas de *Lactobacillus* ssp. con mejores resultados en los ensayos *in vitro* se les realizó el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana; para ello se utilizó el método modificado de difusión en disco impregnado y se sustituyó el agar Müeller Hilton por agar MRS, descrito por Schillinger y Lucke (39). Los antimicrobianos probados fueron: ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 µg), sulfonamidas (300 µg), vancomicina (30 µg), amikacina (30 µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg) y clorafenicol (30 µg) (Sensidisc DME®, Sao Paulo, Brasil). Como control se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Una alícuota de 0,1- 0,2 mL de cada cepa, correspondiente a una concentración celular de 10⁸ -10⁹ UFC/mL, se distribuyó en placas Petri que contenían agar MRS para *Lactobacillus* ssp. y, en BHI para la cepa utilizada como control, *Staphylococcus aureus*. Para ello se empleó la técnica de esparcimiento superficial del inóculo y después se colocaron los discos de antibióticos en la superficie. Se incubaron por 48 h bajo condiciones de anaerobiosis y se midieron los halos de inhibición. Los aislados fueron clasificados para cada uno de los antibióticos como sensibles (S), moderadamente sensible (MS) y resistentes (R), de acuerdo con Charteris *et al.* (40).

Las cepas evaluadas fueron capaces de crecer a 37°C, con crecimiento abundante *Fructobacillus fructosus* SS72, *Lactobacillus rhamnosus* SS73 y *Lactococcus garvieae* SS79; mientras que, a 45°C, únicamente mostraron crecimiento abundante *Fructobacillus fructosus* SS72 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 (Tabla 1). Estos resultados son similares a los encontrados por Sánchez *et al.* (18) en su estudio, donde crecieron 17 cepas del género *Lactobacillus* ssp. a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C), pero los mayores rendimientos de células viables (9,3-10 log UFC/mL) fueron a 37°C. También Laurencio-Silva *et al.*, en la evaluación de cepas BAL para su uso como probióticos (41), encontraron que todas crecían a las temperaturas de incubación, muy similares a las empleadas en este estudio (38°C, 39°C y 40°C). Ello indica que la adaptabilidad de *Lactobacillus* ssp., a diferentes temperaturas, es una característica esencial para la supervivencia de tales microorganismos a las condiciones del ecosistema donde es posible su aplicación.

Hidrólisis de la caseína de la leche (proteólisis)

Solo se apreció hidrólisis de la caseína a las 48 h en *Fructobacillus fructosus* SS72 (Tabla 1). La mayoría de las cepas (80 %) no mostraron actividad proteolítica, lo que coincide con Peres *et al.* (42), quienes reportaron cepas que exhibían baja actividad de la enzima. La variación encontrada entre cepas puede estar dada por componentes de la pared celular o del medio en que se desarrollan las cepas (43). La actividad proteolítica de las cepas es un indicador a tener en cuenta para evaluar la actividad probiótica de las cepas, específicamente referente a la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se generan durante la fermentación del alimento o en el proceso de la digestión; estos incluyen algunas secuencias de aminoácidos que ejercen una actividad biológica específica en el huésped (44).

Tabla 1. Comportamiento del crecimiento a diferentes temperaturas de incubación y valores (mm) del diámetro del halo de proteólisis de la caseína por las BAL aisladas del tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*). / Growth behavior at different incubation temperatures and values (mm) of the casein proteolysis halo diameter by LAB isolated from the digestive tract of bees (*Apis mellifera*).

Cepas	Temperatura de crecimiento		Hidrólisis de la caseína (mm)*.	
	37°C	45°C	24h	48h
<i>F. fructosus</i> SS66	+	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> SS70	++	+	-	-
<i>F. fructosus</i> SS72	+++	+++	-	20
<i>L. rhamnosus</i> SS73	+++	+++	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i> SS79	+++	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Control positivo)	NA	NA	18	45

Referencias: - Ausencia de crecimiento; + Crecimiento muy débil; ++ Crecimiento débil; +++ Crecimiento abundante. NA: no aplica.* Diámetro del halo de proteólisis.

Crecimiento de las cepas aisladas a diferentes pH

Las cinco cepas evaluadas fueron capaces de crecer a pH 6,5; mientras que a pH 5,5 solo *F. fructosus* SS66, *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 mostraron crecimiento abundante (Figura 1). A pH de 4,5 y 3,5 ninguna cepa fue capaz de crecer, lo cual resulta similar a los valores característicos del género *Lactobacillus* spp. Las BAL tienen la capacidad de producir ácido láctico y disminuir el pH del sustrato, aspecto primordial dentro del grupo de los lactobacilos con capacidad probiótica (41). *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 tienen resultados comparables con el obtenido por Ávila *et al.* (45). Landa-Salgado *et al.* (46), al evaluar cepas de *Lactobacillus* spp. bajo condiciones acidas similares (4; 4,5; 6,5), reportaron mejores crecimientos en el medio MRS cuando ajustaron el pH 6,5 (9,07 Log₁₀ UFC/mL), mientras que a pH 4,0 el crecimiento disminuyó a 5,09 Log₁₀ UFC/mL.

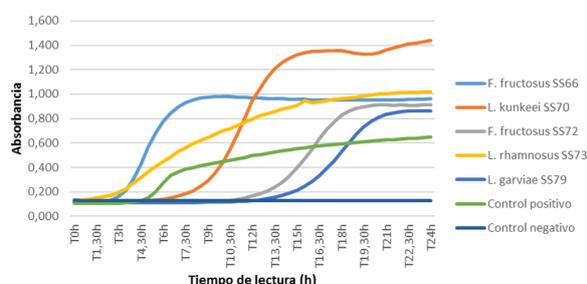


Figura 1. Cinética del crecimiento a pH 5,5 de las cepas BAL evaluadas. / Growth kinetics at pH 5,5 of the LAB strains evaluated.

Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Las cepas resultaron positivas a la prueba de producción de peróxido de hidrógeno con crecimiento abundante y tonalidad azul oscura; resultado similar al reportado por Elenany y Sharaf (47). Dentro de los criterios a tener en cuenta en la evaluación de los probióticos, se incluye la producción de H₂O₂, por constituir factor inhibitor del crecimiento o colonización del intestino por agentes patógenos potenciales (48).

Prueba de coagulación

De las cinco cepas objeto de evaluación (Tabla 2), solo *Fructobacillus fructosus* SS66 (20 %) fue negativa a la prueba de coagulación en todos los tiempos, al compararla con la cepa patrón *L. acidophilus*. La coagulación láctica o ácida se realiza por las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o procedente de diferentes ambientes, que transforman la lactosa en ácido láctico y desciende el pH de la leche, lo que produce la alteración de la caseína hasta la formación de un coágulo; este constituye un importante indicador para nuestras condiciones al permitir mantener las cepas en un medio natural y obtener masa bacteriana (26).

Actividad hemolítica

En el presente trabajo no hubo cepas evaluadas que revelaran actividad hemolítica, con excepción de *Fructobacillus fructosus* SS66 (Tabla 2). Dentro de los indicadores recomendados para evaluar los probióticos, la actividad hemolítica es uno de los criterios de selección dada su relación con la virulencia de las cepas (20, 49). Estos resultados se corresponden con los encontrados por Gutiérrez *et al.* (50), ya que, de las 14 cepas seleccionadas, 10 resultaron ser no hemolíticas. Las bacterias pertenecientes al grupo de las ácidos lácticas generalmente no son patógenas (GRAS) (15) y, por consiguiente, no poseen hemolisinas que destruyan las células rojas, y al ser administradas como posibles probióticos en abejas, no deben presentar ningún problema. No obstante, se reportan cepas de *L. casei* con hemólisis positiva (51).

Descarboxilación de aminoácidos

Las cepas evaluadas no mostraron capacidad para la producción de aminos biógenas (AB): solo la cepa *Lactococcus garvieae* SS79 utilizó la alanina, de los cinco aminoácidos ensayados, pasadas las 36 h. Este es otro indicador de seguridad en la evaluación de cepas candidatas a probióticos (52), pues altas

Tabla 2. Prueba de la coagulación de la leche y actividad hemolítica de las BAL aisladas del tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*). / Milk coagulation test and hemolytic activity of LAB isolated from the digestive tract of bees (*Apis mellifera*).

Cepas	Prueba de la coagulación de la leche*			Actividad hemolítica a las 72 h
	24 h	48 h	72 h	
<i>F. fructosus</i> SS66	-	-	-	+(β)
<i>L. kunkeei</i> SS70	-	+	+	+(α)
<i>F. fructosus</i> SS72	+	+	+	-
<i>L. rhamnosus</i> SS73	+	+	+	+(α)
<i>L. garvieae</i> SS 79	-	-	+	+(α)
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	-

*Referencias: -Ausencia de crecimiento; +Presencia de crecimiento (coagulación de la leche).

concentraciones de aminas en los alimentos, pueden ingresar en la cadena alimentaria y ser responsables de varios problemas toxicológicos en humanos (53). No obstante, la formación de AB se asocia a cepas de *Lactobacillus* spp., tales como *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*, *L. reuteri* y *L. sakei* (54). Tarrah *et al.* (55) realizaron un estudio *in vitro* de cepas de *S. thermophilus* y estas manifestaron diferencias en la producción de AB, por lo que los autores concluyeron que es una característica dependiente de la cepa. En estudios de caracterización de cepas de BAL, otros autores reportan que *S. thermophilus* SS77 fue capaz de utilizar la alanina a partir de las 36 h, mientras que la cepa de *L. acidophilus* SS80, solo lo hizo con la histidina a partir de las 72 h (26).

Crecimiento en Bilis

En la cinética de crecimiento de las diferentes cepas se pudo observar que todas las cepas son capaces de crecer en presencia de bilis al 1 %, aunque se destacan *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 con los mayores valores de crecimiento (Figura 2).

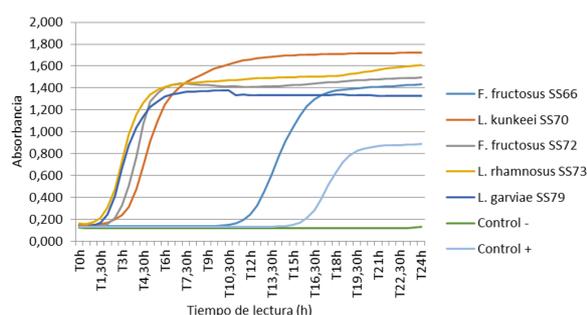


Figura 2. Cinética de crecimiento de las cepas en presencia de bilis al 1 % durante 24 horas. / *Strain growth kinetics in the presence of 1 % bile for 24 hours.*

Gilliland *et al.* (56) encontraron que 0,3 % de sales biliares era un punto crítico de resistencia para cepas de *Lactobacillus* spp., al tener una alta correlación con la supervivencia en los intestinos de los animales incluidos en el ensayo. En pruebas de selección de bacterias lácticas (57), se encontraron cepas de *Lactobacillus* spp. resistentes a sales biliares (0,5 %, 1 %, 2 % y 3 %).

En otros estudios con otras cepas BAL, se reportan cepas de *Streptococcus* spp. capaces de crecer en todas las concentraciones de bilis evaluadas (0,3 %, 0,5 % y 1 %) y cepas de *Lactobacillus* spp. que solo lo hicieron a la concentración de 0,3 % (26), lo que evidencia que los resultados de las bacterias lácteas son variables.

Tolerancia a jugo gástrico artificial (JGA)

Las cepas estudiadas mostraron una alta capacidad de resistencia ante condiciones extremas del JGA; excepto la cepa *Lactococcus garvieae* SS79, el resto de las cepas mostraron una cinética de crecimiento

similar al control (Figura 3) y cumplen con esta condición de exposición, simulándose el paso del alimento a través del tracto gastrointestinal (TGI), después de la permanencia de las bacterias en caldo MRS a pH 3 durante 3 h a 37°C. Para que sean efectivas, las cepas probióticas deben conservar las características de salud funcional para las cuales fueron seleccionadas originalmente. Tales características incluyen la capacidad de sobrevivir el tránsito a través del estómago y el intestino delgado y colonizar el TGI del huésped (58). La sobrevivencia de BAL en el jugo gástrico puede ser independiente del pH. Si bien en el presente trabajo las mediciones con espectrofotómetro no diferencian entre bacterias vivas y muertas, es de suponer que aquellos aislados que muestren incremento en sus lecturas, luego del cese de las condiciones estresantes, pueden ser considerados como tolerantes ya que consiguieron multiplicarse. Los resultados en este estudio, mediante mediciones positivas de la curva de crecimiento realizada durante 24 horas, indican la capacidad de recuperación de las cinco cepas sometidas a los mismos desafíos, respecto a la capacidad de sobrevivir a estas condiciones hostiles.

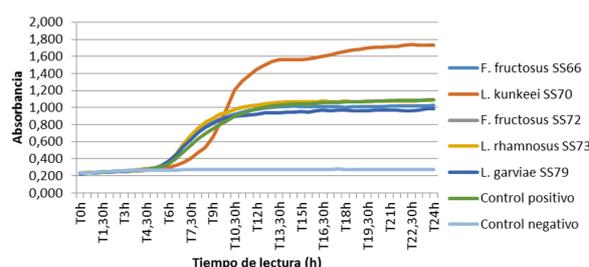


Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas BAL aisladas del tracto digestivo de abejas en el medio MRS después de la exposición con JGA. / *Growth kinetics of LAB strains isolated from the digestive tract of bees in MRS medium after exposure with AGJ.*

Ensayo de autoagregación, coagregación con patógenos intestinales e hidrofobicidad

Los resultados de autoagregación de este estudio no coinciden con los reportados por otros autores (59) que encontraron porcentos de autoagregación en las cepas estudiadas entre 88,4 % y 95,6 %. Este mismo autor encontró altos porcentos de coagregación frente a los patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella thyphymurium*, que pueden ser comparados con las cepas BAL investigadas, *L. rhamnosus* SS73 y *L. kunkeei* SS70, que produjeron coagregación contra *Escherichia coli* (Tabla 3).

Las BAL pueden inhibir la adherencia de bacterias patógenas a la mucosa del intestino, ya sea mediante una barrera por autoagregación o por coagregación directa con los patógenos. En la mayoría de los casos, la capacidad de agregación está relacionada con las propiedades de adherencia celular, lo que también implica su capacidad para sobrevivir y persistir en el tracto gastrointestinal (60).

Tabla 3. Resultados de los ensayos de autoagregación, coagregación e hidrofobicidad (120 min), (n=3), de las cepas BAL aisladas del tracto digestivo de abejas. / *Results of the self-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity tests (120 min), (n = 3), of the LAB strains isolated from the digestive tract of bees.*

Cepas	Resultados			Hidrofobicidad (%) (n-hexadecano)
	Autoagregación	Coagregación		
		<i>Salmonella dublin</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>F. fructosus</i> 66	-	-	-	22,53 ^d ± 0.503
<i>L. kunkeei</i> 70	-	-	+	46,04 ^e ± 0.093
<i>F. fructosus</i> 72	-	-	-	57,70 ^c ± 0.755
<i>L. rhamnosus</i> 73	-	-	+	47,89 ^a ± 0.110
<i>L. garvieae</i> 79	-	-	-	12,45 ^b ± 0.478

Leyenda: + Autoagregación positiva, ++ fenotipo coagregante no compacto, +++ fenotipo coagregante compacto. Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre ensayos ($p < 0,05$).

La hidrofobicidad fue variable entre las cepas, de acuerdo a la clasificación establecida. *F. fructosus* SS72 exhibió un valor alto, *L. rhamnosus* SS73 y *L. kunkeei* SS70 medio y *L. garvieae* SS79 y *F. fructosus* SS66 bajo (Tabla 3). Estos resultados solo se comparan con los obtenidos por Goel *et al.* (61), quienes encontraron porcentos de hidrofobicidad para las cepas de *L. plantarum* evaluadas entre 55,57 % y 54,0 % para el xileno y 42,9 y 40,88 % para el hexadecano. Se describen en dos aislados de *L. plantarum* altos valores de hidrofobicidad entre 85,26 % a 94,9 % para el xileno y de 4,3 % a 48,37 % para el cloroformo (62).

También se plantea que existe una correlación entre la habilidad por la adhesión y la hidrofobicidad de algunos *Lactobacillus*. La naturaleza hidrófoba de la superficie más externa de los microorganismos se relaciona con la unión de las bacterias al tejido del huésped; esta propiedad podría conferir una ventaja competitiva, importante para el mantenimiento bacteriano en el sistema gastrointestinal (60).

Por su parte, Dlamini *et al.* (63) observaron altos valores de autoagregación (60 a 70 %) y coagregación (45 a 56 %), en cuatro cepas de BAL, después de 4 h de incubación a 37°C, así como una alta hidrofobicidad para todos los solventes utilizados: xileno (78-84 %), cloroformo (68-75 %) y etil acetato (52-60 %).

Actividad antimicrobiana frente a patógenos

Otra de las características que facilita la selección de cepas que puedan ser consideradas como potenciales probióticos, es su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. A partir de la escala del halo de inhibición, el 100 % de las cepas evaluadas exhibieron actividad antagonista contra la totalidad de los patógenos estudiados, con variaciones entre ellas (Tabla 4). Se ha reportado la producción de sustancias inhibitoras para todo el género de *Lactobacillus*, incluyendo a *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, así como *Enterococcus*

(48). No obstante, no siempre se dispone de un completo análisis de la naturaleza de las sustancias antagonistas que producen las cepas evaluadas.

Se describe por varios autores que, en esta actividad, pueden estar presentes ácidos orgánicos como son ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas (48,57,64); mecanismos que podrían sustentar el resultado mostrado por las cepas incluidas en el estudio.

En el ensayo de enfrentamiento a patógenos, las BAL aisladas del intestino de abejas, se observó que solo *Lactobacillus* AJ5, IG9, A15 y CRL1647 fueron capaces de inhibir *S. aureus* ATCC29213, *B. cereus* C1, *E. coli*O157: H7, *L. monocytogenes* y *P. larvae* (65). *Lactobacillus kunkeei*, aislado de intestino de abejas, fue capaz de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (66). Resultados similares de inhibición se observaron con cepas de BAL (MA3 y MA4) aisladas de *Apis mellifera* frente a *L. monocytogenes* y *E. coli* (67). En estudio de aislamientos y caracterización de BAL de origen floral, se encontró que *Fructobacillus fructosus*, *Lactobacillus kunkeei*, *Enterococcus durans* y *Lactobacillus brevis* exhibieron efecto inhibitorio frente a los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (68).

Las cepas BAL se enfrentaron a uno de los patógenos de mayor importancia en la producción apícola: *Paenibacillus larvae*. Todas las cepas produjeron inhibición en alguna de las técnicas utilizada (Tabla 5), excepto *Fructobacillus fructosus* SS66, lo que demuestra la interacción de factores con efecto inhibitorio sobre *P. larvae*. Otros autores demuestran que cepas BAL, aisladas del intestino de abejas, fueron capaces de inhibir diferentes patógenos, incluyendo *P. larvae* (69, 70).

En ensayo a nivel de laboratorio con larvas de abejas se ha comprobado que el suministro del consorcio bacteriano aislado de intestino de abejas: *Lactobacillus plantarum* Lp39, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus kunkeei* BR-1, redu-

Tabla 4. Actividad inhibitoria (Diámetros del halo de inhibición, mm) de las cepas BAL aisladas del tracto digestivo de abejas frente a cepas patógenas. $n = 3$. / *Inhibitory activity (inhibition halo diameters, mm) of the LAB strains isolated from the digestive tract of bees against pathogenic strains. $n = 3$*

Cepas	<i>Listeria monocitogenes</i>	<i>Salmonella dublin 595</i>	<i>Escherichia coli 289</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>F. fructosus</i> SS66	18,26 ^{cd} ±0.262	16,57 ^c ±0.252	16,73 ^c ±0.058	16,90 ^d ±0.10	15,57 ^b ±0.153
<i>L. kunkeei</i> SS70	16,03 ^b ±0.153	13,0 ^a ±0.10	11,0 ^a ±0.20	11,2 ^a ±0.264	16,17 ^c ±0.153
<i>F. fructosus</i> SS72	17,9 ^c ±0.10	17,20 ^d ±0.200	16,37 ^c ±0.115	12,94 ^b ±0.053	13,67 ^a ±0.153
<i>L. rhamnosus</i> SS73	12,77 ^a ±0.058	16,37 ^c ±0.153	18,77 ^d ±0.058	14,53 ^c ±0.058	15,90 ^b ±0.10
<i>L. garvieae</i> SS79	18,7 ^d ±0.20	14,13 ^b ±0.162	15,05 ^b ±0.132	16,67 ^d ±0.153	17,98 ^d ±0.025

Leyenda: Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre ensayos ($p < 0,05$).

Tabla 5. Prueba de Inhibición de las BAL aisladas desde el tracto digestivo de abejas (*Apis mellifera*) frente a *Paenibacillus larvae*. $n=3$. / *Inhibition test of LAB isolated from the digestive tract of bees (Apis mellifera) against Paenibacillus larvae. $n = 3$*

Cepas	Diámetro del halo de inhibición (mm) -Técnica Spot		Diámetro del halo de inhibición (mm)-Técnica estría	
	24h	72h	24h	72h
<i>F. fructosus</i> SS66	-	-	-	-
<i>L. kunkeei</i> SS70	14,83 ^d ±0.153	14,93 ^d ±0.163	-	-
<i>F. fructosus</i> SS72	5 ^b ±0,00	5 ^b ±0,00	13 ^a ±0,115	12,93 ^a ±0.058
<i>L. rhamnosus</i> SS73	12 ^c ±0,153	12,03 ^c ±0,153	27 ^b ±0,058	27,13 ^b ±0,115
<i>L.garvieae</i> SS79	4 ^a ±0,115	4 ^a ±0,153	13 ^a ±0,115	13,13 ^a ±0,153

Leyenda: Superíndices diferentes, en una columna, denotan diferencias significativas entre ensayos ($p < 0,05$).

ce la carga de patógenos, aumenta la expresión de genes de inmunidad claves y mejora la supervivencia durante la infección por *P. larvae* (22). De igual forma, siete cepas bacterianas aisladas de intestino de abejas melíferas se enfrentaron a la cepa *P. larvae* ATCC9545 por el método de difusión de disco, donde se incluyó *Lactobacillus kunkeei* (KY027158), y mostraron fuertes efectos inhibitorios frente al patógeno evaluado (69).

De las cinco cepas de *Lactobacillus* ssp. caracterizadas, *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 manifestaron un mejor comportamiento en varios de los diferentes parámetros evaluados (crecimiento a temperatura 45°C, crecimiento a pH 5,5, coagulación a patógenos intestinales y antagonismo contra el *P. larvae*); así mismo, dentro de las principales cepas estudiadas *in vitro* con fines probióticos en las abejas, se encuentran *L. kunkeei* (71, 72, 73, 74) y *L. rhamnosus* (22, 59); además, con estas cepas se reportan resultados benéficos al ser administradas a las colmenas (16, 22), por lo cual se consideran las candidatas probióticas para inocular el jarabe de sacarosa a administrar a las abejas en periodos de hambruna.

Ensayo de antibiorresistencia

La capacidad que manifiestan algunas cepas de resistencia a los antibióticos es un criterio determinante y restrictivo para ser seleccionado como posible probiótico. Con relación a las dos cepas (*L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73) seleccionadas como posibles probióticos, mostraron sensibilidad frente a todos los antibióticos evaluados, excepto a la Sulfonamida y Vancomicina (Tabla 6); lo que sugiere que estas

cepas no transmitirán mediadores de resistencia antimicrobiana hacia otros microorganismos presentes en el hospedero.

Los resultados concuerdan con otros autores (14, 75), quienes indican que *Lactobacillus* ssp. y *Bifidobacterium* ssp. son sensibles frente a la mayoría de estos antibióticos. En un estudio sobre resistencia a antibióticos convencionales utilizados en medicina, de cinco cepas de BAL aisladas del estómago de la abeja melífera (*L. fermentum* (HM027462), *L. kunkeei* (GQ451631), *L. pentosus* (HM027640), *Lactobacillus* Taj Naser-1 (GQ451611), *Lactobacillus* ssp. Taj Makhdzir-Naser-1 (GQ451633), se reportan en la mayoría de ellas niveles de sensibilidad similares a los encontrados en el presente trabajo; aunque algunas de las cepas mostraron resistencia (76). También se reportan en otros estudios variación en las cepas de *Lactobacillus* a los antibióticos (77), pero la mayoría es sensible a los fármacos de uso clínico; aunque no todos los mecanismos de resistencia a antibióticos en *Lactobacillus* ssp son intrínsecos.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Lactobacillus* ssp., caracterizadas mediante pruebas *in vitro*, demostraron tener potencial como probiótico al cumplir con los parámetros básicos, como son resistencia a pH ácido, sales biliares, amplio espectro de actividad antimicrobiana y efecto inhibitorio frente a *Paenibacillus larvae* y otros patógenos de interés sanitario: *Listeria monocitogenes*, *Salmonella dublin 595*, *Escherichia coli 289*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 6. Diámetro de los halos (mm) de las cepas de *L. kunkeei* SS y *L. rahamnosus* SS 73 aisladas del tracto intestinal de las abejas frente a antibióticos de diferentes familias. / Halo diameter (mm) of *L. kunkeei* SS and *L. rahamnosus* SS 73 strains isolated from the intestinal tract of bees against antibiotics from different families.

Agente Antimicrobiano	Diámetro de los halos de las cepas (mm)	
	<i>L. kunkeei</i> SS 70	<i>L. rahamnosus</i> SS 73
Amikacina (30 µg)	10	12
Amoxicilina (10 µg)	31	34
Ampicilina (10 µg)	35	41
Cefalotina (30 µg)	41	23
Ceftriaxona CRO (30 µg)	40	10
Ciprofloxacina (5 µg)	17-18	33
Cloranfenicol (30 µg)	26	27-28
Cefalexina (30 µg)	25-24	13-15
Eritromicina (15 µg)	23-25	30-35
Gentamicina (10 µg)	12-10	20-22
Oxacilina (1 µg)	20	15
Meropenem (10 µg)	27-28	25-26
Penicilina G (10 µg)	27	30
Sulfonamida (300 µg)	0	0
Vancomicina (30µg)	0	0

Los exponentes que mejor comportamiento obtuvieron en las pruebas *in vitro* fueron *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73; estas cepas están en condiciones de ser incorporadas en un inóculo probiótico y evaluadas en un ensayo *in vivo* en estudios adicionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Cuba; al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), al Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL) y al Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, por poner a nuestra disposición los recursos y las tecnologías de laboratorio para el desarrollo de los ensayos, en el marco del convenio de movilidad docente e investigativa existente entre la UNISS-LARISA-UNL.

REFERENCIAS

- Hudson JA, Frewer LJ, Jones G, Brereton PA, Whittingham MJ, Stewart G. The agri-food chain and antimicrobial resistance. Trends in Food Science and Technology. 2017.
- Aidara-Kane A, Angulo FJ, Conly JM, Minato Y, Silbergeld EK, McEwen SA, et al. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2018;7(1):7.
- Gao P, Ma C, Sun Z, Wang L, Huang S, Su X, et al. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. Microbiome. 2017;5(1):91.
- Tonello NV. Caracterización de nuevos medicamentos no contaminantes para el tratamiento de enfermedades apícolas [Doctoral]. Argentina: Universidad Nacional de Rio Cuarto; 2019.
- Bonilla-Rosso G, Engel P. Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. Current opinion in microbiology. 2018;43:69-76.
- Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. PNAS. 2017;114(18):4775-80.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R Soc open sci. 2017;4:1-9.
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol Ecol. 2013;37:699-735.
- Budge GE, Adams I, Thwaites R, Pietravalle S, Drew GC, Hurst GDD, et al. Identifying bacterial predictors of honey bee health. Journal of Invertebrate Pathology. 2016:1-19.
- Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, et al. The Bee Microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. Mbioasmorg. 2016;7(2):1-9.
- Khalafalla GM, Sadik MW, Ali MAM, Mohamed RS. Novel potential probiotics from gut microbiota of honeybees (*Apis mellifera*) in clover feeding season in Egypt. Plant Archives. 2019;19(2):3381-3389.

12. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014;11(8):506.
13. Markowiak P, Ślizewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*. 2018;10(1):21.
14. Miranda-Yuquilema JE, Marin-Cárdenas A, Sánchez-Macías D, García-Hernández Y. Obtención, caracterización y evaluación de dos preparados candidatos a probióticos desarrollados con residuos agroindustriales. *Revista MVZ Córdoba*. 2018;6487-6499.
15. Yao W, Yang L, Shao Z, Xie L, Chen L. Identification of salt tolerance-related genes of *Lactobacillus plantarum* D31 and T9 strains by genomic analysis. *Annals of Microbiology*. 2020;70(1):1-14.
16. Alberoni D, Baffoni L, Gaggia F, Ryan P, Murphy K, Ross P, *et al.* Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. *Beneficial microbes*. 2018;9(2):269-278.
17. Khare A, Thorat G, Bhimte A, Yadav V. Mechanism of action of prebiotic and probiotic. *immunity (Choct, 2009; Williams et al, 2001)*. 2018;3:27.
18. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira C. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev Salud Anim*. 2015;32(2):11.
19. Thakur N, Rokana N, Panwar H. Probiotics, Selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology* January. 2016;3(1):259-270.
20. FAO/WHO. WHO works group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food London. Ontario, Canada, April. 2002;30.
21. Audisio MC. Gram-Positive bacteria with probiotic potential for the *Apis mellifera* L. honey bee: The Experience in the Northwest of Argentina. *Probiotics & Antimicro Prot*. 2016:1-10.
22. Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, Al KF, Chernyshova AM, Faragalla KM, *et al.* Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME journal*. 2020 14(2):476-491.
23. Hernández García JE, Rodríguez Díaz JA, Sebastián Frizzo L, Fernández León KJ, Solenzal Y, Paola Soto L, *et al.* Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de abejas adultas *Apis mellifera*. *Rev Salud Anim*. 2020;42(2):9.
24. Harrigan WF. *Laboratory methods in food microbiology*: Gulf professional publishing; 1998.
25. Mclean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *Journal of medical microbiology*. 2000; 49(6):543-552.
26. Hernández-García JE, Sebastián-Frizzo L, Rodríguez-Fernández JC, Valdez-Paneca G, Virginia-Zbrun M, Calero-Herrera I. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Rev Salud Anim*. 2019;41(1).
27. Balamurugan R, Chandragunasekaran AS, Chellappan G, Rajaram K, Ramamoorthi G, Ramakrishna BS. Probiotic potential of lactic acid bacteria present in homemade curd in southern India. *The Indian journal of medical research*. 2014;140(3):345.
28. Mete A, Cosansu S, Demirkol O, Ayhan K. Amino acid decarboxylase activities and biogenic amine formation abilities of lactic acid bacteria isolated from shalgam. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(1):171-178.
29. Uriot O, Denis S, Junjua M, Roussel Y, Dary-Mouro A, Blanquet-Diot S. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *Journal of Functional Foods*. 2017;37:74-89.
30. Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, *et al.* Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*. 2010;21(5):695-701.
31. Reniero R, Cooconcelli P, Bottazzi V, Morelli L. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology* 1992;138:763-768.
32. Maldonado NC, Ficoseco CA, Mansilla FI, Melián C, Hébert EM, Vignolo GM, *et al.* Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock science*. 2018;212:99-110.
33. Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World journal of urology*. 2006;24(1):28-32.
34. Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi I, Sequeira G, Marti LE, Rosmini MR. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*. 2006;5.
35. Nader-Macías MEF, Otero MC, Espeche MC, Maldonado NC. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *Journal of industrial*

- microbiology and biotechnology. 2008;35(11):1387-1395.
36. Kajal A, Ankur G, Jagriti S. Isolation and identification of Lactobacilli bacteria from raw cow milk in local region of Agra. *Int J Adv Res Biol Sci.* 2017;4(11):98-102.
 37. Fleming H, Etchells J, Costilow R. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology.* 1975;30(6):1040-1042.
 38. Iorizzo M, Testa B, Lombardi SJ, Ganassi S, Ianiro MFL, *et al.* Antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: Potential benefits for honeybee health. *Antibiotics.* 2020;9(442):2-18.
 39. Schillinger U. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology.* 1989;55(8):1901-1906.
 40. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection.* 1998;6(12):1636-1643.
 41. Laurencio-Silva M, Arteaga F, Rondón-Castillo AJ, Ormaza J, Pinto J, Pazmiño D, *et al.* Potencial probiótico *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. procedentes de la vagina de vacas lecheras. *Pastos y Forrajes.* 2017;40(3):206-215.
 42. Peres CM, Alves M, Hernandez-Mendoza A, Moreira L, Silva S, Bronze MR, *et al.* Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT-Food Science and Technology.* 2014;59(1):234-246.
 43. Matthews A, Grimaldi A, Walker M, Bartowsky E, Grbin P, Jiranek V. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(10):5715-5731.
 44. Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *The Journal of nutrition.* 2004;134(4):989S-995S.
 45. Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica.* 2010;20(2):161-169.
 46. Landa-Salgado P, Caballero-Cervantes Y, Ramírez-Briebesca E, Hernández-Anguiano AM, Ramírez-Hernández LM, Espinosa-Victoria D, *et al.* Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano. *Revista mexicana de ciencias pecuarias.* 2019;10(1):68-83.
 47. Elenany Y, Sharaf El-Din H. Detection and Identification of novel bacterial strains isolated from fresh clover bee honey. *Journal of Plant Protection and Pathology.* 2019;10(1):49-52.
 48. Iranmanesh M, Ezzatpanah H, Mojgani N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT-food Science and Technology.* 2014;58(2):355-359.
 49. De Vuyst L, Moreno MF, Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol.* 2003;84(3):299-318.
 50. Gutiérrez RLA, David RCA, Montoya COI, Betancur GE. Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Rev Salud Anim.* 2016;38(2):8.
 51. Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Casquete R, Serradilla MJ, de Guía Córdoba M. Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat science.* 2009;83(3):460-467.
 52. Hazards EPoB. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *Efsa Journal.* 2011;9(10):2393-2486.
 53. Ladero Losada VM, Martín MC, Redruello B, Mayo Pérez B, Flórez García AB, Fernández García M, *et al.* Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. 2015.
 54. Pereira C, Crespo MB, San Romao M. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int J Food Microbiol.* 2001;68(3):211-216.
 55. Tarrach A, Castilhos J, Rochele Cassanta R R, Da Silva V D, Righetto D Z, Corich V, *et al.* *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Frontiers in Microbiology.* 2018;9:1-11.
 56. Gilliland S, Staley T, Bush L. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science.* 1984;67(12):3045-3051.
 57. Jurado-Gómez H, Martínez BJA, Chaspuengal TA, Calpa FY. Evaluation *in vitro* of the action of *Lactobacillus plantarum* with probiotic characteristics on *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 2014;12(2):49-59.
 58. Kenfack CHM, Kaktcham PM, Ngoufack FZ, Wang YR, Yin L, Zhu T. Screening and characterization of putative probiotic *Lactobacillus* strains from honey bee gut (*Apis mellifera*). *J Advances in Microbiology.* 2018:1-18.
 59. Meryandini A, Karyawati AT, Nuraida L, Lestari Y. Lactic Acid Bacteria from *Apis dorsata* hive

- possessed probiotic and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Activity. Makara Jof Science. 2020;24(1):7.
60. Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. J dairy science. 2013;96(7):4252-4257.
61. Goel A, Halami PM, Tamang JP. Genome Analysis of *Lactobacillus plantarum* isolated from some Indian fermented foods for Bacteriocin production and probiotic marker genes. Frontiers in microbiology. 2020;11.
62. TR K. Probiotic potency of *Lactobacillus plantarum* KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. FEMS microbiology letters. 2018;365(4):285.
63. Dlamini ZC, Langa RL, Aiyegoro OA, Okoh AI. Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. Probiotics and antimicrobial proteins. 2019;11(2):397-402.
64. Elshaghabee FM, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. Frontiers in microbiology. 2017;8:1490.
65. Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. Microbiological research. 2011;166(1):1-13.
66. UĞRAŞ S. Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. Türkiye Entomoloji Dergisi. 2017;41(3):253-261.
67. Putri I, Jannah SN, Purwantisari S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Apis mellifera* and their potential as antibacterial using *in vitro* test against growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. NICHE J of Tropical Biology. 2020;3(1):26-34.
68. Saleh G. Isolation and characterization of unique fructophilic lactic acid bacteria from different flower sources. Iraqi Journal of Agricultural Science. 2020;51(2):508-518.
69. Al-Ghamdi A, Al-Abbadi AA, Khan KA, Ghramh HA, Ahmed AM, Ansari MJ. *In vitro* antagonistic potential of gut bacteria isolated from indigenous honey bee race of Saudi Arabia against *Paenibacillus larvae*. Journal of Apicultural Research. 2020:1-9.
70. Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. Journal of invertebrate pathology. 2013;112(1):62-67.
71. Janashia I, Choiset Y, Jozefiak D, Déniel F, Coton E, Moosavi-Movahedi AA, et al. Beneficial protective role of endogenous lactic acid bacteria against mycotic contamination of honeybee beebread. Probiotics and antimicrobial proteins. 2018;10(4):638-646.
72. Kačaniová M, Kunová S, Ivanišová E, Terentjeva M, Gasper J. Antimicrobial effect of *Lactobacillus kunkeei* against pathogenic bacteria isolated from bees' gut. Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies/Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii. 2019;52(2).
73. Olofsson TC, Vásquez A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. Current microbiology. 2008;57(4):356-363.
74. Tajabadi N, Mardan M, Manap MYA, Shuhaimi M, Meimandipour A, Nateghi L. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. Apidologie. 2011;42(5):642.
75. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira CdL. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. Rev Salud Animal. 2015;37(2):94-104.
76. Gharehyakkeh S, HosseinElhamirad A, Nateghi L, Varmira K. Evaluation of resistance to conventional antibiotics in medicine by 5 strains of Lactic Acid Bacteria isolated from the stomach of honey bee. Asian Journal of Biological and Life Sciences. 2017;6(3).
77. Anisimova EA, Yarullina DR. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. Current microbiology. 2019;76(12):1407-1416.

Conflicto de Intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses relacionados con el presente artículo.

Contribución de los autores: José Antonio Rodríguez Díaz: participó en el diseño de los experimentos, en la ejecución y evaluación de los ensayos, escribió y revisó el documento. Juan Emilio Hernández García: diseñó los experimentos, participó en su ejecución y escribió y revisó el documento. Laureano Sebastián Frizzo: participó en la ejecución y supervisión de los métodos de ensayos y revisó el documento. Ken Jact Fernández León: participó en la colecta y procesamiento de los datos y en la revisión del documento. Yovanni Solenzal Valdivia: participó en la colecta de los datos y en la revisión del documento. Lilian Sánchez Miranda: supervisó y ejecutó los métodos de ensayos; participó en la revisión del documento. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final del documento.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)