

# Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de abejas adultas *Apis mellifera*



## Isolation and identification of lactic acid bacteria from the digestive tract of adult bees *Apis mellifera*

<https://eqrcode.co/a/n0ipT6>

 Juan Emilio Hernández García <sup>1\*</sup>, José Antonio Rodríguez Díaz <sup>2</sup>, Laureano Sebastián Frizzo <sup>3,5</sup>, Ken Jact Fernández León <sup>2</sup>, Yovanni Solenzal Valdivia <sup>2</sup>, Lorena Paola Soto <sup>3,4</sup>, Delso Viciedo Gallo <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sancti Spiritus “José Martí Pérez”. Cuba.

<sup>2</sup>Laboratorio de Referencia de Investigación y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spiritus Cuba.

<sup>3</sup>Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL). Argentina.

<sup>4</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, FCV, Argentina.

<sup>5</sup>Unidad Empresarial de Base, Apicultura, Sancti Spiritus, Cuba.

**RESUMEN:** Los objetivos del estudio fueron aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) a partir del tracto digestivo de abejas *Apis mellifera*. Se obtuvieron 35 aislamientos, de ellos 13 se consideraron como BAL por sus características morfológicas y bioquímicas. Se amplificó mediante PCR y usando cebadores universales un fragmento del gen ADNr 16S a partir del ADN bacteriano. Los productos de PCR obtenidos se purificaron y secuenciaron. Las secuencias obtenidas se compararon con otras depositadas en la base de datos GenBank. Las cepas también se identificaron mediante caracterización proteómica utilizando MALDI TOF MS. Los resultados mostraron la presencia de cuatro géneros de BAL; predominaron *Lactobacillus* spp. (38,4 %) y *Fructobacillus* spp. (30,8 %) y, en el análisis por especies, se identificaron *Lactobacillus kunkeei* (31 %) y *Fructobacillus fructosus* (31 %). El presente estudio confirma el predominio del género *Lactobacillus* dentro de las bacterias ácido láctico del tracto digestivo de las abejas. Esta investigación es la primera en reportar aislamiento e identificación molecular de BAL obtenidas desde el tracto digestivo de abejas melíferas en Cuba.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus* spp., ADNr 16S, microbiota intestinal.

**ABSTRACT:** The aim of the study was to isolate and identify lactic acid bacteria (LAB) from the digestive tract of *Apis mellifera* bees. Thirty-five bacterial isolates were obtained and 13 of them were considered LAB due to their morphological and biochemical characteristics. A fragment of the 16S rDNA gene was amplified by PCR and using universal primers from the bacterial DNA. The obtained PCR products were purified and sequenced. The sequences obtained were compared with others deposited in the GenBank database. The strains were also identified by proteomic characterization using MALDI TOF MS. The results showed the presence of four genera of LAB, with *Lactobacillus* spp. (38.4 %) and *Fructobacillus* spp. (30.8 %) predominating. *Lactobacillus kunkeei* (31 %) and *Fructobacillus fructosus* (31 %) were identified in the analysis by species. This study confirms the predominance of the *Lactobacillus* genus within the lactic acid bacteria of the digestive tract of bees. This research is the first to report isolation and molecular identification of LAB obtained from the digestive tract of honey bees in Cuba.

**Key words:** *Apis mellifera*, lactic acid bacteria, *Lactobacillus* spp., 16SrDNA, gut microbiota.

\*Autor para la correspondencia: Juan Emilio Hernández García: E-mail: [juanemilio@uniss.edu.cu](mailto:juanemilio@uniss.edu.cu)

Recibido: 20/03/2020

Aceptado: 16/06/2020

## INTRODUCCIÓN

Las abejas, *Apis mellifera*, son uno de los más importantes insectos en el ecosistema terrestre, no solamente por la producción de miel, dadas sus virtudes nutritivas y terapéuticas, sino además por su papel esencial como polinizadores de diferentes especies de plantas entomófilas (1-3). De ellas depende la supervivencia y evolución de más del 80 % de las especies vegetales (4), aunque este desempeño se puede alterar debido a la transformación de sus ecosistemas, como consecuencia de los cambios climáticos que se suceden en la actualidad (5).

La microbiota del tracto digestivo de las abejas es muy variada y está asociada al tipo de alimentación que se aplica en las colmenas, el sistema de explotación, la estacionalidad y el estado de salud (6). Otros autores han reportado que las abejas melíferas poseen una alta especificidad de la comunidad microbiana intestinal; se componen por alrededor de ocho filotipos (7) donde predominan tres grupos fundamentalmente en la comunidad intestinal, *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* y *Lactobacillus* spp. (8).

En Pakistán reportaron el aislamiento e identificación de microorganismos desde el intestino de abejas de diferentes zonas del país y mostraron tres filos de bacterias: *Firmicutes* (60 %), *Proteobacteria* (26 %) y *Actinobacteria* (14 %) (9); mientras que Kwong y Moran (10) en su estudio refieren siete filos específicos de microorganismos identificados mediante secuenciación del gen ADNr 16S, en los que se incluyen cuatro filos de *Proteobacteria*, dos *Firmicutes* y uno *Actinobacterium*.

Las especies de bacterias ácido lácticas (BAL) predominantes en el estómago e intestino de abejas *Apis mellifera*, *A. dorsata* y *A. bumble* pertenecen al género *Lactobacillus* (11) e incluye alrededor de 174 especies (12). La carga microbiana intestinal de las larvas es más baja que en las abejas adultas, pero la composición taxonómica es similar (13); no obstante, la variabilidad está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales (14).

Los lactobacilos son bacterias catalasa negativas, Gram positivas y usualmente en forma de bacilos. Los mismos se encuentran en gran

variedad de hábitat de origen vegetal y el tracto gastrointestinal de los animales, incluyendo las abejas melíferas (15) y se emplean en la producción de varios alimentos fermentados de origen animal y vegetal.

La identificación y la diferenciación de la microbiota de BAL en abejas se orientan en los últimos años al uso de métodos con bases moleculares y se considera la secuenciación del gen ADNr 16S como el patrón estándar para la identificación y el análisis filogenético de BAL (16). Diferentes regiones de este gen se emplean para identificar especies de *Lactobacillus* (17-19). El empleo de la caracterización proteómica mediante MALDI TOF MS (Matrix - Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight MassSpectrometry), para identificar microorganismos patógenos y benéficos, se ha incrementado en los últimos años, aprovechando su rapidez y precisión para obtener resultados (20).

La utilización de especies de *Lactobacillus* como probióticos se continúa sugiriendo en la apicultura por la estimulación del sistema inmune innato de las abejas, debido a la producción de sustancias inhibitoras e intervención en acciones fisiológicas, ayudándolas a sobrevivir contra el efecto de patógenos (21,22) y así favorecer el estado de salud general de las mismas (23,24). De ahí la importancia de aislar cepas de estas especies y realizar su identificación acorde a estándares internacionales, para caracterizar su desempeño como probióticos en investigaciones futuras.

Los objetivos de este trabajo fueron aislar e identificar cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) del tracto digestivo de abejas adultas *A. mellifera*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Las muestras de abejas *Apis mellifera* se colectaron entre los meses enero y marzo de 2017; se conformaron tres lotes de 25 abejas adultas cada uno, que representaban diferentes colmenas y unidades de producción apícola de la provincia Sancti Spiritus, Cuba. Para su transportación y conservación, se introdujeron en frascos estériles hasta su llegada al laboratorio (Laboratorios Novatec de Cuba).

## Aislamiento de BAL del intestino de abejas

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA). Se siguió el protocolo descrito por Engel (16); las abejas de cada uno de los lotes fueron previamente desinfectadas (Solución clorada al 1 %) y lavadas tres veces con solución salina peptonada estéril (SSPE) para eliminar contaminantes externos. A continuación, bajo condiciones de esterilidad se conformaron tres grupos que contenían fragmentos del abdomen de las abejas (20 a 25 abejas cada uno). Finalmente, se transfirieron a 25 mL de SSPE en bolsas estériles y se maceraron durante tres minutos en un equipo Biomaster Seward Stomacher 80.

La siembra de las muestras maceradas se realizó en los medios de Man Rogosa Sharpe (MRS), *Lactobacillus* Anaerobic MRS con Vancomicina y Verde de Bromocresol, (LAMVAB) y *Streptococcus thermophilus* (ST). Para ello se realizaron diluciones seriadas 1:10, tomando 1 mL para 9 mL en solución Ringer estéril y se sembraron en placas, utilizando 0,1 mL por cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Los medios inoculados se incubaron a 37°C durante 72 h bajo condiciones anaeróbicas ( $H_2:CO_2=90:10$ ) en jarras de anaerobiosis con vacuomanómetro OXOID HP0011 (Oxoid, UK). Se realizaron dos réplicas.

A partir de los cultivos en los medios MRS, LAMVAB y ST, se procedió por observación macroscópica a la selección de las colonias que cumplían con las características presuntivas a los géneros en estudio: colonias elevadas, de superficie gruesa y brillante, bordes elevados, coloración blanquecina y cremosa (25).

La Tinción de Gram y la prueba de catalasa (26) se realizaron como tamizaje inicial de las colonias con características culturales presuntivas del género *Lactobacillus* spp. La presencia de forma bacilar, cocobacilos, Gram positivo y catalasa negativo se consideraron como parámetros para la selección. Los aislamientos se conservaron en el banco de cepas del laboratorio a -80°C en caldo MRS (Britania) suplementado con glicerol estéril al 20 % (Merck, Darmstadt, Germany) para los futuros análisis.

## Extracción del ADN bacteriano, amplificación del ADNr 16S y secuenciación del fragmento amplificado

Las cepas se identificaron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, mediante la secuenciación del ADNr 16S. Primeramente se procedió a la extracción del ADN genómico de las cepas mediante el uso de un kit de purificación de ADN comercial DNAzol® (Molecular Research Center, Inc). El gen ADNr 16S se amplificó mediante PCR con un termociclador (MJ Research®) usando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTTGTTAC GACTT-3') (Lane, 1991). Cada tubo de PCR contenía una mezcla de reacción de 10 µL de buffer 5X (Promega®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (Promega®), 0,4 µM de cada primer y 2U de *Taq* polimerasa (Promega®) en un volumen final de 50 µL. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 94°C durante 5 min; 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; y una extensión final de 72°C durante 7 min. Los productos de PCR de aproximadamente 1500 pb se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v, con tinción de GelRed® bajo luz UV. Los productos de PCR obtenidos de 13 cepas fueron purificados con el juego de reactivos Wizard PCR SV Gel & PCR Clean- Up System (Promega®) y luego secuenciados (Macrogen, Korea del Sur). Las secuencias obtenidas se compararon con otras depositadas en la base de datos GenBank (National Centre for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, MD), usando el algoritmo de BLAST (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## Caracterización proteómica utilizando MALDI TOF MS

La identificación de los aislamientos mediante MALDI TOF MS (Matrix - Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) se realizó directamente a partir de una colonia aislada adhiriendo la misma a la placa metálica de MALDI. Las placas con las tarjetas MALDI se introdujeron en el

espectrómetro de masa MALDI TOF para las mediciones automatizadas y la interpretación de datos. Los perfiles del espectro de masa MALDI TOF fueron importados con el software MALDI Biotyper 3.0 y procesados automáticamente después de las mediciones. La comparación con la base de datos arrojó un resultado de identificación mostrando género y especie bacteriana y su porcentaje de precisión.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los cultivos de muestras de abdomen de abejas en los medios MRS, LAMVAB y ST, se procedió por observación macroscópica a la selección de las colonias que cumplieran con las características que permitían considerarlas como pertenecientes a los géneros en estudio.

Se obtuvieron 35 aislamientos a partir del tracto digestivo de las abejas *A. mellifera* en los

medios MRS, LAMVAB y ST por observación macroscópica de las colonias y de ellas 13 cepas se consideraron como posibles BAL por la morfología, coloración Gram positiva en la tinción y prueba catalasa negativa. El análisis de las secuencias obtenidas reveló 98 y 99 % de identidad con los siguientes géneros y especies (Tabla 1).

En la caracterización proteómica utilizando MALDI TOF MS, solo dos cepas (*Lactobacillus rhamnosus* y *Lactococcus garvieae*) pudieron ser identificadas mediante esta técnica (Tabla 1), debido a que el resto de las cepas correspondieron a especies que aún no estaban incorporadas en la base de datos empleada.

Cuando los aislamientos se agruparon (Tabla 2), se apreció la existencia de cuatro géneros de BAL, predominando *Lactobacillus* spp. (38,4 %) y *Fructobacillus* spp. (30,8 %) y, en el análisis por especies (Fig. 1), destacan *L. kunkeei* (31 %) y *F. fructosus* (31 %).

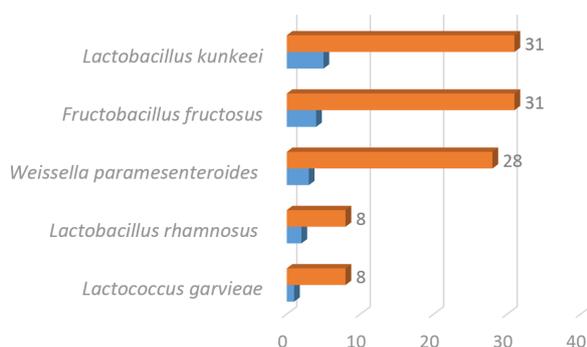
**Tabla 1.** Bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas a partir del tracto digestivo de abejas e identificadas mediante secuenciación del ADNr 16S y MALDI TOF MS. / *Lactic acid bacteria (LAB) isolated from the digestive tract of bees and identified by 16S rDNA and MALDI TOF MS sequencing.*

Aislamiento	Gram		Catalasa		Identificación bacteriana			
					Secuenciación ADNr 16S		MALDI TOF MS	
					Especie bacteriana	Querycover (%)	Ident (%)	Especie bacteriana
SS66	+	-	<i>Fructobacillus fructosus</i>	99	99	No encontrada	-	
SS67	+	-	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100	98	No encontrada	-	
SS68	+	-	<i>Fructobacillus fructosus</i>	100	99	No encontrada	-	
SS69	+	-	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100	98	No encontrada	-	
SS70	+	-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100	99	No encontrada	-	
SS71	+	-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100	99	No encontrada	-	
SS72	+	-	<i>Fructobacillus fructosus</i>	99	99	No encontrada	-	
SS73	+	-	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	100	99	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,90	
SS74	+	-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100	99	No encontrada	-	
SS75	+	-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100	99	No encontrada	-	
SS76	+	-	<i>Fructobacillus fructosus</i>	100	98	No encontrada	-	
SS78	+	-	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99	99	No encontrada	-	
SS79	+	-	<i>Lactococcus garvieae</i>	100	99	<i>Lactococcus garvieae</i>	95,90	

**Tabla 2.** Porcentaje de aislamiento de los diferentes géneros encontrados en el tracto digestivo de abejas melíferas./ *Percentage of isolation of the different genera found in the digestive tract of honey bees.*

No.	Géneros	%
1	<i>Lactobacillus</i> spp.	38,4
2	<i>Fructobacillus</i> spp.	30,8
3	<i>Weissella</i> spp.	23,1
4	<i>Lactococcus</i> spp.	7,7

Las bacterias ácido lácticas son abundantes en el estómago de las abejas melíferas, predominan las del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (27). El género *Lactobacillus* es el grupo más importante dentro de los BAL y usualmente se encuentra como parte de la microbiota del tracto digestivo de humanos y animales, siendo utilizado como probióticos en estas especies (16).



**Figura 1.** Cepas predominantes (%) de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir del tracto digestivo de las abejas *Apis mellifera* en Cuba./ *Predominant strains (%) in the isolation of lactic acid bacteria obtained from the digestive tract of Apis mellifera bees in Cuba.*

Los *Lactobacillus* spp. aislados de la miel y del tracto digestivo de las abejas melíferas pueden ser seleccionados y usados para la preservación de alimentos, para su enriquecimiento y como suplemento probiótico en el consumo humano o para su uso en las propias abejas para mejorar su estado de salud (28).

De igual forma, se ha asociado la fortaleza de la colonia con la taxonomía del tracto intestinal de las abejas; se ha podido comprobar a los *Lactobacillus* spp. dentro de los géneros predominantes en colmenas fortalecidas, sugiriéndose que el perfil de la microbiota podría usarse como una herramienta de diagnóstico en las prácticas de apicultura y predecir la salud de las colmenas y guiar el manejo de las mismas (19).

Un estudio comparativo de BAL aisladas desde el intestino de abejas melíferas y desde flores (mediante estudios filogenéticos y de plásmidos) mostró el predominio de bacterias ácido lácticas y Bifidobacterias y, dentro de ellas, las especies *Lactobacillus kunkeei* y *Fructobacillus fructosus* (29).

Históricamente, muchos ensayos para aislar e identificar BAL empleaban métodos basados en el cultivo de las cepas (30). Ensayos más recientes han aplicado la amplificación de cultivos independientes mediante la secuenciación del gen ADNr 16S para estudiar esa comunidad basado en el polimorfismo de cada cepa (16,31). En el presente estudio, el método de cultivo clásico fue combinado con la secuenciación de ADNr 16S para describir la diversidad bacteriana y su relación filogenética con *Lactobacillus* spp. presentes en el tracto digestivo de las abejas adultas *A. mellifera*.

El estudio se dirigió al aislamiento de BAL dominantes en el tracto digestivo de las abejas más explotadas en Cuba (*A. mellifera*), las cuales se someten a un nuevo y complejo ecosistema (4). Los resultados del análisis filogenético mostraron que en las muestras estudiadas existen cinco géneros diferentes de *Lactobacillus*. Las cepas dominantes de lactobacilos totalizaron el 31 % y fueron más cercanas a las especies previamente descritas (*L. kunkeei* y *F. fructosus*). Estas especies son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) y varias cepas de *L. kunkeei* y *F. fructosus* se han aislado desde diferentes nichos ecológicos, vinculados con el entorno apícola (32). En un estudio sobre lactobacilos fructófilos (LABF) en abejas melíferas, Endo y Salminen (33) reportaron como grupos predominantes los pertenecientes a *L. kunkeei* y *F. fructosus*. Otros autores hacen idéntica consideración cuando aíslan cepas desde el tracto intestinal de abejas y señalan que las cepas de *Lactobacillus kunkeei* son las especies predominantes durante las estaciones de hambruna (34).

Un estudio sobre diversidad de bacterias ácido lácticas, asociadas con abejas melíferas y su posible uso como probióticas para manejar condiciones estresantes (25), reportó que de los 42 aislamientos siete fueron los géneros predominantes *Enterococcus* spp. (23,8 %),

*Micrococcus* spp. (18,8 %), *Streptococcus* spp. (13,8 %), *Pediococcus* spp. (13,8 %), *Lactobacillus* spp. (10,0 %), *Lactococcus* spp. (10,0 %) y *Leuconostoc* spp. (10,0 %).

En el mismo sentido, Ribière *et al.* (19), con el uso de técnicas de aislamiento selectivas y la secuenciación de ADNr 16S de *Lactobacillus* spp. de muestras de flores e intestino de abejas, identificaron, en ambos casos, dentro de las especies más frecuentes *Lactobacillus kunkeei* y *Fructobacillus fructosus*. Además, en un estudio filogenético y de plásmidos, los resultados mostraron el predominio de las bacterias ácido lácticas de las especies *Lactobacillus kunkeei* y *Fructobacillus fructosus* (29).

Las otras especies de BAL encontradas en el tracto digestivo de las abejas fueron *W. paramesenteroides* y *L. rhamnosus*, reportadas en estudios y ambientes vinculados a las abejas (19,35,36).

En la provincia Tucuman, Argentina, se aislaron diferentes bacterias ácido lácticas desde frutas y flores y caracterizadas genotípicamente; las 21 especies encontradas pertenecían a seis géneros: *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. Dentro de las especies se encontraron *L. rhamnosus* y *F. fructosus* (37); ambas cepas también se hallaron en el presente estudio de la microbiota intestinal de las abejas. Estos hallazgos hablan de la relación que existe entre la microbiota de las flores y la de las abejas y que ha sido reportada en un estudio reciente (38), aunque las abejas suelen tener una comunidad microbiana diversa en número y metabólicamente (39) y estar asociadas a las condiciones medioambientales en que se desarrollan (14).

Se ha encontrado también en estudios de aislamiento y caracterización por secuenciación de ADNr 16S de BAL, en hojas de plantas y frutas, especies de *W. paramesenteroides* junto con *L. plantarum*, *E. faecalis* y *Lactobacillus paraplantarum* (19,40); por lo que no es inusual que esta especie pueda aparecer en la microbiota intestinal de las abejas, también se refiere en estos casos de comunidades intestinales erráticas

que consisten en bacterias ambientales que varían ampliamente entre los individuos (41).

La otra especie identificada, *Lactococcus garvieae*, es menos reportada en ambientes asociados a las abejas; no obstante, se halló en la valoración de la microbiota del pequeño escarabajo (*Aethina tumida*) que presenta relación con las abejas melíferas como huésped (42). Este mismo autor asoció *L. kunkeei* y *L. garvieae* en las abejas, aunque ubicó a *L. garvieae* como un microorganismo patógeno. En estudio de identificación de la microbiota intestinal de abejas *A. mellifera*, se reportan las familias *Lactococcaceae*, *Micrococcaceae* y *Staphylococcaceae* en el recuento de bacterias Gram positivas; dentro de las especies, estos autores identificaron *Lactococcus garvieae* por MALDI TOF MS (43); resultado que se corresponde con el presente estudio.

Generalmente, las cepas de *Lactococcus garvieae* son aisladas desde productos fermentados y en rebrotes de plantas; ambientes con los cuales las abejas pueden tener contacto; especies de *L. garvieae* también se vinculan a procesos patológicos en peces y se han evaluado como benéficos en otros casos (44,45). *L. garvieae* LG34 aislado desde pepino fermentado chino produjo una bacteriocina de Clase II con un amplio espectro inhibitor y mostró que tenía el potencial para su utilización como biopreservador de alimentos (46); no obstante, se necesitan estudios adicionales para dilucidar su presencia en la microbiota de las abejas y las flores.

Nueve de las especies de BAL encontradas se han reportado como posibles agentes benéficos en abejas, aunque las mismas suelen tener una comunidad microbiana diversa en número y metabólicamente (39) y esta hay que verla contextualizada, tanto ecológica como ambientalmente. La investigación sobre el empleo de probióticos es de gran utilidad para incidir positivamente en la salud de esta especie, evitar el uso de antibióticos en su crianza y eliminar efecto residual en la miel y otros productos apícolas que constituyen una de las ramas exportables más importantes del país (47).

## CONCLUSIONES

Este estudio confirma el predominio del género *Lactobacillus* dentro de las bacterias ácido láctico (BAL) del tracto digestivo de las abejas. Las especies de BAL dominantes fueron *Lactobacillus kunkeei* y *Fructobacillus fructosus*. Las principales especies de BAL encontradas se han utilizado como agentes probióticos, por lo que deben continuarse los ensayos a nivel de laboratorio para evaluar su comportamiento. Esta investigación es la primera en informar aislamiento e identificación molecular de BAL del tracto digestivo de abejas melíferas en Cuba.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Referencia de Investigación y Salud Apícola. (LARISA), Cuba; 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

1. Demedio JL, Sanabria JL, Leal A, Lóriga W, Fonte L. Polinización apícola: una invitación a los agricultores. Revista CEDAR Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez" Cuba. 2011.
2. Kwong WK, Moran NA. Evolution of host specialization in gut microbes: the bee gut as a model. *Gut Microbes*. 2015;6(3):214-220.
3. Romero S, Nastasa A, Chapman A, Kwong WK, Foster LJ. The Honey Bee Gut Microbiota: Strategies for Study and Characterization. *Insect molecular biology*. 2019.
4. Verde MM. Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2014;48(1):25.
5. Sandoz MAM. Efectos del cambio climático sobre la polinización y la producción agrícola en América Tropical. *Revista Ingeniería*. 2016;26(1):11-20.
6. Marche MG, Satta A, Floris I, Pusceddu M, Buffa F, Ruiu L. Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2019;58(3):444-454.
7. Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PloS one*. 2012;7(4):e36393.
8. Cariveau DP, Powell JE, Koch H, Winfree R, Moran NA. Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME journal*. 2014;8(12):2369.
9. Anjum SI, Shah AH, Aurongzeb M, Kori J, Azim MK, Ansari MJ, et al. Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi journal of biological sciences*. 2018;25(2):388-392.
10. Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(6):374.
11. Tajabadi N, Mardan M, Manap MYA, Shuhaimi M, Meimandipour A, Nateggi L. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honey bee *Apis dorsata* *Apidologie*. 2011;42(5):642-649.
12. Chahbar N, Mahamed AL. Contribution to identification of the microflora of the digestive tract and pollen of Algerian honeybees: *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. *International Journal Current Microbiology Applied Sciences*. 2014;3(6):7.
13. Anderson KE, Rodrigues PA, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V. Ecological succession in the honey bee gut: shift in *Lactobacillus* strain dominance during early adult development. *Microbial ecology*. 2016;71(4):1008-1019.
14. Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F, Al Toufalilia H, Balfour NJ, Bork P, et al. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and evolution*. 2018;8(1):441-451.

15. Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(6):3189-3194.
16. Engel P, James RR, Koga R, Kwong WK, McFrederick QS, Moran NA. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *J Apicultural Res.* 2013;52(4):24.
17. Settanni L, van Sinderen D, Rossi J, Corsetti A. Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough *Lactobacillus* species by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(6):3049-3059.
18. Yoshiyama M, Kimura K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebrate Pathology.* 2009;84:6.
19. Libonatti C, Agüeria D, García C, Basualdo M. *Weissella paramesenteroides* encapsulation and its application in the use of fish waste. *Revista Argentina de Microbiología.* 2019;51(1):81-83.
20. Olofsson TC, Butler É, Markowicz P, Lindholm C, Larsson L, Vásquez A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees-an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities in vitro. *International Wound Journal.* 2016;13(5):668-679.
21. Lamei S, Stephan JG, Riesbeck K, Vasquez A, Olofsson T, Nilson B, et al. The secretome of honeybee-specific lactic acid bacteria inhibits *Paenibacillus* larvae growth. *J Apicultural Res.* 2019:1-8.
22. Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017;114(18):4775-4780.
23. 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 Oroteins.* 2018;10(4):638-646.
24. Rabadjiev Y, Christova P, Iliev I, Ivanova I. Identification of a Lactic Acid Bacterial flora within the honey intestinal tract of *Apis mellifera* from different regions of Bulgaria. *Journal of BioScience & Biotechnology.* 2015;Special Edition: pp.215-219.
25. Mathialagan M, Edward Y, David P, Senthilkumar M, Srinivasan M, Mohankumar S. Isolation, characterization and identification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees. *International J Current Microbiol Applied Sci.* 2018;7:849-906.
26. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait.* 2003;83(4):269-306.
27. Sharifpour MF, Mardani K, Ownagh A, editors. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. isolated from gut of honeybees (*Apis mellifera*) from West Azerbaijan, Iran. *Veterinary Research Forum;* 2016: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
28. Tajabadi N, Mardan M, Abdul Manap M Y, Mustafa S. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *J Apicultural Res.* 2013;52(5):7.
29. Gallefoss I. A Comparative Analysis on Phylogeny, Genetics and Selected Phenotypes of Lactic Acid Bacteria Isolated from Gut Microbiota of Honey Bee Versus Flowers. Thesis:Master/Technology - Chemistry and Biotechnology, Molecular Biology Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science. 2016.
30. Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol Letters.* 1997;155(1):1-10.
31. Tajabadi N, Mardan M, Saari N, Mustafa S, Bahreini R, Abdul Manap MY. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian J Microbiol.* 2013;44(3):6.
32. Gallefoss I. A comparative analysis on phylogeny, genetics and selected phenotypes of lactic acid bacteria isolated from gut microbiota of honey bee versus flowers:

- Norwegian University of Life Sciences, As.2016.
33. Endo A, Salminen S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiol.* 2013;36(6):444-448.
  34. Rangberg A, Mathiesen G, Amdam GV, Diep DB. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Beneficial Microbes.* 2015.
  35. Yu AO, Leveau JH, Marco ML. Abundance, diversity and plant-specific adaptations of plant-associated lactic acid bacteria. *Environmental Microbiology Reports.* 2020;12(1):16-29.
  36. Meryandini A, Karyawati AT, Nuraida L, Lestari Y. Lactic Acid Bacteria from *Apis dorsata* Hive Possessed Probiotic and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Activity. *Makara Journal of Science.* 2020;24(1):7.
  37. Ruiz Rodriguez LG, Mohamed F, Bleckwedel J, Medina RB, De Vuyst L, Hebert EM, et al. Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiol.* 2019;10:1091.
  38. Vuong HQ, McFrederick QS. Comparative genomics of wild bee and flower isolated *Lactobacillus* reveals potential adaptation to the bee host. *Genome Biology and Evolution.* 2019.
  39. Ellegaard KM, Brochet S, Bonilla-Rosso G, Emery O, Glover N, Hadadi N, et al. Genomic changes underlying host specialization in the bee gut symbiont *Lactobacillus Firm5*. *Molecular Ecology.* 2019;28(9):2224-2237.
  40. Samedi L, Charles AL. Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Annals of Agricultural Sciences.* 2019.
  41. Samedi L, Charles AL. Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Annals of Agricultural Sciences.* 2019;64:55-62.
  42. Huang Q, Lopez D, Evans JD. Shared and unique microbes between Small hive beetles (*Aethina tumida*) and their honey bee hosts. *MicrobiologyOpen.* 2019:e899.
  43. Kačániová 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).
  44. Kačániová M, Gasper J, Brindza J, Schubertová Z, Ivanišová E. Bacteria of *Apis mellifera* gastrointestinal tract: counts, identification and their antibiotic resistance. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality.* 2017(1).
  45. Chi H. Garvicin KS. A bacteriocin with wide inhibitory spectrum and potential application. Norwegian University of Life Sciences Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science. [Thesis Philosophiae Doctor (PhD)]. 2018.
  46. Gao Y, Li D, Liu S, Zhang L. Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* isolated from traditional Chinese fermented cucumber. *Food Control.* 2015;50:896-900.
  47. Amaral CM. El análisis de patentes, herramienta para la determinación de líneas de investigación sobre probióticos en Cuba. INFO'2008 IV Seminario internacional sobre estudios cuantitativos y cualitativos de la ciencia y la tecnología "Prof. Gilberto Sotolongo Aguilar". 2008.

**Contribución de los autores:** Juan Emilio Hernández García: diseñó los experimentos, participó en su ejecución y escribió y revisó el documento. José Antonio Rodríguez Díaz: participó en el diseño de los experimentos, en su ejecución y escribió y revisó el documento. Laureano Sebastián Frizzo: participó en el diseño de los experimentos, en su ejecución y escribió y revisó el documento. Ken Jact Fernández León: participó en la colecta 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. Lorena Paola Soto: participó en la colecta y procesamiento de los datos y en la revisión del documento. Delso Vicedo Gallo: participó en la colecta y procesamiento de los datos y en la revisión 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/)