

## Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*

*Probiotic potential of bacteria isolated from pollen bread to improve the production and health of Apis mellifera*

María José Cabana<sup>1\*</sup>, Marcos Raúl Tejerina, José José<sup>1</sup>,  
Ricardo Manuel Castro<sup>1</sup>, Marcelo Rafael Benítez Ahrendts<sup>1</sup>

### RESUMEN

Las abejas *Apis mellifera* se encuentran afectadas por virus, bacterias, parásitos, plaguicidas, hongos o modificaciones en el ambiente que influyen en su microbiota intestinal y causan impactos negativos en su sistema inmunológico y en su comportamiento. Uno de los patógenos que inciden en el intestino es el hongo *Ascosphaera apis*, cuyas esporas ingresan al interior de las larvas, las colonizan y momifican. Una alternativa a esta situación es el suministro de bacterias probióticas, que refuerzan la microbiota intestinal y contribuyen a la defensa contra este hongo. Sin embargo, el pan de polen es uno de los productos de las colmenas (mezcla de miel, polen, néctar, sustancias salivares), que generan el hábitat para la obtención de estas bacterias. El objetivo de este trabajo fue aislar, seleccionar e identificar genéticamente cepas de *Lactobacillus* spp., con potencial probiótico del polen conservado, para una futura aplicación en colmenas que favorezcan la salud de las abejas. Las muestras fueron recolectadas de apiarios de la Provincia de Jujuy. Se seleccionaron bacterias del género *Lactobacillus* spp. a las cuales se les realizaron pruebas para evaluar su capacidad probiótica: crecimiento a temperaturas (30, 37 y 40 °C), tolerancia a pH (3, 4 y 7), bilis (0,3 y 1%), hemólisis, sensibilidad a antibióticos y antagonismo frente a *A. apis* LSAPJuy (MH633693). Las cepas seleccionadas fueron secuenciadas con 16S y depositadas en GenBank. Se obtuvieron 17 cepas que crecieron a las temperaturas sometidas. Sin embargo, en el ensayo de acidez y bilis crecieron 10 cepas, con  $\gamma$ -hemólisis y sensibilidad a los antibióticos. De las 10 cepas, 6 lograron inhibir el hongo: *Lactobacillus kunkeei* LSJ (MF435935), *Lactobacillus melliventris* LSAM (MF435936), *Lactobacillus helsingborgensis* LSAI (MF435934), con dos repeticiones cada una. Se seleccionaron estas bacterias para una futura aplicación en colmenas.

**Palabras clave:** *Lactobacillus* spp., colmena, *Ascosphaera apis*.

### ABSTRACT

*Apis mellifera* bees are affected by viruses, bacteria, parasites, pesticides, fungus, or environmental modifications affecting their intestinal microbiota, which cause negative impacts on the immune system and behavior. One of the pathogen that affects the gut is *Ascosphaera apis* fungi, whose spores enter inside the larvae, colonize and mummified. An alternative to this situation is the supply of probiotic bacteria, which strengthen the intestinal microbiota and contribute to the defense against this fungi; however, the pollen bread, one of the products of the hive (mixture of honey, pollen, nectar, salivary substances), which generate the habitat for obtaining these bacteria. The objective of this work was to isolate, select and genetically identify strains of *Lactobacillus* spp., probiotic potential of conserved pollen, for a future application in hives that favor the health of bees. The samples were collected from apiaries in the Province of Jujuy were selected bacteria of the genus *Lactobacillus* spp. to which tests were carried out to evaluate their probiotic capacity: growth at temperatures (30, 37 and 40 °C), tolerance to pH (3, 4 and 7), bile (0.3 and 1%) hemolysis, sensitivity to antibiotics and antagonists against *A. apis* LSAPJuy (MH633693). The selected strains were sequenced with 16S and deposited in GenBank. As a result 17 strains were obtained that grew at the temperatures subjected, however in the acidity and bile test, 10 strains grew, with  $\gamma$ -hemolysis and sensitivity to antibiotics. Of the 10 strains, 6 were able to inhibit the fungus, identified as: *Lactobacillus kunkeei* LSJ (MF435935), *Lactobacillus melliventris* LSAM (MF435936), *Lactobacillus helsingborgensis* LSAI (MF435934), with two repetitions each. These bacteria were selected for a future application in hives.

**Keywords:** *Lactobacillus* spp., hive, *Ascosphaera apis*.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Jujuy-Facultad de Ciencias Agrarias-Laboratorio de Sanidad Apícola. Jujuy, Argentina.

\* Autor por correspondencia: mariajosecabanv@gmail.com

## Introducción

La microbiota intestinal de las abejas *Apis mellifera* se encuentra afectada por diversos factores, los cuales producen disbiosis. Entre esos factores están la temperatura, deficiencia nutricional, pesticidas, parásitos y patógenos (Raymann *et al.*, 2017).

Uno de los patógenos, que se distribuyen por todo el mundo, y que afectan el intestino de las larvas de las abejas *Apis mellifera*, es el hongo heterotálico *Ascophaera apis*. Las larvas de abejas ingieren las esporas, las cuales se depositan en su tubo digestivo, donde posteriormente germinan y producen su momificación (Aronstein y Murray, 2010).

Una alternativa frente a esta situación es la aplicación de bacterias probióticas, las cuales confieren beneficios a la salud como reforzar la barrera intestinal, modular el sistema inmune y formar parte de la composición y actividad de la microbiota intestinal (Gómez, 2016).

Para que una bacteria láctica sea considerada probiótica debe cumplir requisitos como ser viable, segura, tolerante a jugo biliar y gástrico, y sobrevivir a través del tracto gastrointestinal. Además debe adherirse y colonizar las células epiteliales intestinales (Yadav *et al.*, 2016).

Estudios recientes mostraron que del intestino de abejas se aislaron bacterias lácticas como *Lactobacillus salivarius* A3iob, cuya aplicación en colmenas produce la reducción de *Nosema* spp. y *Varroa destructor* (Tejerina *et al.*, 2020).

Sin embargo, uno de los productos de las colmenas, el pan de polen o polen conservado, que es una mezcla de pólenes florales recolectados por abejas mezcladas con sustancias salivares y considerando los microorganismos asociados a las abejas, produce una sucesión de moho, levadura y bacterias. Entre las bacterias se encuentran las ácido lácticas (Vásquez y Olofsson, 2009).

Por lo tanto, la búsqueda de bacterias probióticas que favorezcan la microbiota intestinal de las abejas (*Apis mellifera*) frente a la presencia de patógenos, parásitos, plaguicidas y cambios de temperatura, es uno de los grandes desafíos que se presentan en la apicultura.

El objetivo de este trabajo fue aislar, seleccionar e identificar genéticamente cepas de *Lactobacillus* spp., con posible potencial probiótico del pan de polen,

para una futura aplicación en colmenas que favorezca la salud de las abejas.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Sanidad Apícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy.

El procesamiento y análisis de las muestras se llevó a cabo durante el periodo de abril a junio y septiembre a noviembre, épocas de mayor entrada de polen.

### Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras se obtuvieron de diversos apiarios de la Provincia de Jujuy. Se llevaron al Laboratorio de Sanidad Apícola y se enriquecieron en caldo Man Rogosa Sharp (MRS), cuya composición presentó proteasa peptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, monoleata de sorbitán, fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso. Las muestras se incubaron por 24 h en microaerofilia, condición que se logró a partir del empleo de frascos herméticos, donde se colocaron las muestras sembradas y una vela para disminuir el nivel de oxígeno.

Transcurrido este tiempo se sembraron en agar MRS, en las condiciones establecidas anteriormente. Después de 24 horas de incubación se seleccionaron, de acuerdo al protocolo de Chamba *et al.* (1994), aquellas placas que presentaban entre 100 y 150 colonias. Posteriormente se eligieron aproximadamente 10 colonias, que correspondieron a la raíz cuadrada del total de estas.

### Selección e identificación de cepas lácticas

Las cepas se eligieron por las características fenotípicas que definen al género *Lactobacillus* spp. Estas incluyen características macroscópicas como la morfología de su colonia y características microscópicas: bacterias Gram positivas y endosporado negativo. Se realizaron también las pruebas de catalasa negativa.

Posteriormente se llevaron a una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/ml), donde se realizaron las pruebas para determinar la capacidad de potencial probiótico.

## Prueba de potenciales probióticos

### *Prueba de crecimiento a diferentes temperaturas*

Las cepas seleccionadas se incubaron a 30, 37 y 40 °C en caldo MRS durante 48 horas, en condiciones de microaerofilia. Transcurrido este período se observó la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland, con la finalidad de corroborar el crecimiento a las temperaturas sometidas.

### *Tolerancia de crecimiento en diferentes pH*

Se evaluó el crecimiento de las colonias bacterianas a pH (7,5 y 3), donde se ajustó el caldo MRS con HCL 1N con el potenciómetro para medios ácidos y con Na (OH) para el medio con pH 7. Luego se inocularon las colonias seleccionadas para el ensayo y se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37 °C por 4 horas. Posteriormente se sembraron en medio de cultivo agar MRS por 24 horas en microaerofilia, para realizar la lectura de las UFC/ml. (Klayraung *et al.*, 2008). Transcurrido este tiempo se observó el crecimiento de las colonias en los diferentes pH. Se realizó la lectura de las UFC/ml de las colonias bacterianas que crecieron a pH 3 (Moreno Galarza, 2012).

### *Tolerancia a diferentes concentraciones de bilis de buey*

Para esta prueba se utilizaron concentraciones de 0,3 y 1% de bilis de buey. Las cepas se sembraron en caldo MRS, ajustadas previamente con las diferentes concentraciones de bilis. Se incubaron a 37 °C en microaerofilia por 4 horas.

Transcurrido este período se sembraron en placas de agar MRS por 24 horas, en las condiciones descritas anteriormente para el recuento de las UFC/ml (Monteagudo *et al.*, 2012). Se observó el crecimiento de las cepas bacterianas en ambas concentraciones, y se contabilizaron solamente las colonias de bacterias que crecieron a una concentración de bilis del 1% (Moreno Galarza, 2012).

## Actividad hemolítica

Se preparó agar Columbia con 5% de sangre cordero, donde se sembraron las cepas lácticas a 37 °C, en condiciones de microaerofilia por 24, 48 y 72 h. Se realizó la lectura de hemólisis en cada uno de los días mencionados (Balamurugan *et al.*, 2014).

## Prueba de sensibilidad de antibióticos

Para la prueba de sensibilidad a antibióticos, se procedió a sembrar las cepas en medio agar MRS. Posteriormente se colocaron discos de antibióticos de penicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) y eritromicina (15 µg). Transcurridas 24 h, se observó si las cepas eran resistentes, moderadamente sensibles o sensibles a los antibióticos (Charteris *et al.*, 1998).

## Prueba de inhibición contra *Ascophaera apis*

La cepa fúngica fue obtenida de polen comercial proveniente de la provincia de Jujuy y se encuentra en el cepario del Laboratorio de Sanidad Apícola, Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU. Las cepas fueron depositadas en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y correspondieron a LSAPJuy (MH633693).

Previamente a la evaluación del efecto antagónico de las bacterias sobre el hongo, se cultivaron los *Lactobacillus* en medio líquido MRS a 37 °C, en condiciones de microaerofilia. Se inoculó 50 µl (2 x10<sup>8</sup> UFC/ml) de las bacterias en medio agar MY20 (medio selectivo de *A. apis*). Posteriormente se sembró un explante del hongo en el centro de la placa de 7 mm de diámetro. Se realizaron 5 repeticiones de cada muestra, con sus respectivos controles. Se incubaron en condiciones de crecimiento del hongo, las cuales correspondieron a 30 °C en microaerofilia (Reynaldi *et al.*, 2015).

Transcurridos 14 días, se midió el diámetro y se observó el aspecto de las colonias fúngicas. Las bacterias que presentaron mayor poder de inhibición sobre el hongo y que evitaron la esporulación se seleccionaron para la identificación genética.

## Identificación genotípica de las bacterias lácticas

Para la identificación genética, la extracción de ácidos nucleicos se efectuó a partir de bacterias crecidas en medio líquido MRS, empleando el protocolo descrito por Cariaga- Martínez y Zapata (2007).

Se amplificó la región génica que codifica el gen 16S (~1500 pb), utilizando los cebadores 124Eub\_1542reverse (5'-AGAAAGGAGGTGA TCCAGCC3'YEub\_9\_2 forward (5'GAGTTTG ATCCTGCTCAG-3') de Invitrogen SA, Argentina (Audisio *et al.*, 2011). La amplificación se realizó por PCR. Se mezcló 1X de tampón, 2,5 mM de

cloruro de magnesio, 200MM dNTPs, 10  $\mu$ M de cada cebador y 0,5 U Taq polimerasa, en 20  $\mu$ l de volumen final de reacción.

Se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos. Se amplificó la secuencia de interés mediante 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 53 °C por 40 segundos y 72 °C durante 40 segundos. Los fragmentos fueron purificados y secuenciados por MacroGen Services. Se empleó el programa de BioEdit para el análisis de los cromatógrafos. Las secuenciaciones se compararon y alinearon con las bases de datos GenBank con el programa BLAST del servidor de red NCBI (Tejerina *et al.*, 2018). Posteriormente las secuenciaciones se depositaron en la base de datos GenBank.

### Análisis estadístico

Para analizar los resultados se utilizó el software estadístico INFostat, a partir de un diseño complementario aleatorio (DCA). Para mayor información se empleó el test de Tukey (Di Rienzo *et al.*, 2008).

### Resultados y discusión

Se obtuvieron 45 muestras de los apiarios visitados, donde a partir de las características macroscópicas y microscópicas del género *Lactobacillus* spp. (Yadav *et al.*, 2016), se seleccionaron 17 cepas, las cuales fueron identificadas como LB1, LB2, LB3, LB4, LB5, LB6, LB7, LB8, LB9, LB10, LB11, LB12, LB13, LB14, LB15, LB16, LB17.

La evaluación del crecimiento de las colonias bacterianas a tres temperaturas diferentes (30, 37 y 40 °C), que se compararon con la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland, indicó el crecimiento de las 17 cepas lácticas. Ello permitió establecer que las bacterias resistieron a los cambios de temperatura. Este es uno de los ensayos importantes para evaluar la capacidad probiótica, debido a que en el transcurso de la vía digestiva se generan estas condiciones térmicas (González Montiel *et al.*, 2010).

El crecimiento de las cepas sometidas a pH (3, 4 y 7) mostró la resistencia de algunas bacterias y la inhibición de otras. Las cepas LB1, LB9, LB12, LB14, LB15, LB16 y LB17 no crecieron en pH 3 (Tabla 1).

Se registró el desarrollo de 10 colonias de bacterias lácticas, las cuales evidenciaron la capacidad para tolerar la acidez. Acorde con lo expuesto por Wang *et al.* (2017), es importante que

Tabla 1. Crecimiento de *Lactobacillus* spp. obtenidas del polen conservado en pH 3 durante 4 horas.

Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. del polen conservado	Contabilización de UFC/ml para pH3
LB1	No crecieron colonias
LB2	6,1 x 10 <sup>6</sup>
LB3	3,5 x 10 <sup>6</sup>
LB4	3,2 x 10 <sup>6</sup>
LB5	2,1 x 10 <sup>6</sup>
LB6	5,8 x 10 <sup>6</sup>
LB7	1,1 x 10 <sup>6</sup>
LB8	2,1 x 10 <sup>6</sup>
LB 9	No crecieron colonias
LB10	1,3 x 10 <sup>6</sup>
LB11	2 x 10 <sup>6</sup>
LB12	No crecieron colonias
LB13	2,3 x 10 <sup>6</sup>
LB14	No crecieron colonias
LB15	No crecieron colonias
LB16	No crecieron colonias
LB17	No crecieron colonias

las bacterias lácticas resistan a los ácidos, tanto para su crecimiento, como para la fermentación y elaboración de productos.

Por otra parte, la prueba de bilis de buey a las colonias bacterianas determinó la inhibición de algunas bacterias y el crecimiento de otras. LB1, LB9, LB12, LB14, LB15, LB16 y LB17 no se desarrollaron a las diferentes concentraciones sometidas (Tabla 2).

Sin embargo, 10 colonias lograron soportar el efecto de los ácidos biliares, y las bacterias no se mostraron limitadas por la presencia de esta sustancia. Lebeer *et al.* (2018) expresaron que las bacterias lácticas secretan enzimas hidrolasas (BHs), las cuales se activan como ácidos biliares. Entre ellas se encuentran la hidrolasa ácido taurodesoxicólico (TDCA) y la hidrolasa ácido taurocólico (TCA). Los ácidos biliares participan en diversos procesos metabólicos como la regulación de la absorción de grasas, metabolismo del colesterol y creación de condiciones homeostáticas en la membrana de la bacteria. Se regula la base nitrogenada, las grasas y los aminoácidos, lo que genera cambio en la grasa, donde se producen los exopolisacáridos, que actúan como agente de protección contra las sales biliares.

Por otra parte, este grupo de bacterias no mostró sensibilidad a los antibióticos (penicilina 10  $\mu$ g, gentamicina 10  $\mu$ g y eritromicina 1  $\mu$ g).

Tabla 2. Crecimiento de *Lactobacillus* spp. obtenidas del polen conservado en concentraciones de 1% de bilis de buey, en un período de 4 horas.

Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. del pan de polen	Contabilización de UFC/ml para 1%
LB1	No crecieron colonias
LB2	2,3 x 10 <sup>6</sup>
LB3	1,1 x 10 <sup>6</sup>
LB4	1,3 x 10 <sup>6</sup>
LB5	1,1 x 10 <sup>6</sup>
LB6	2,1 x 10 <sup>6</sup>
LB7	1,4 x 10 <sup>6</sup>
LB8	1,3 x 10 <sup>6</sup>
LB9	No crecieron colonias
LB10	1,1 x 10 <sup>6</sup>
LB11	1,6 x 10 <sup>6</sup>
LB12	No crecieron colonias
LB13	1,4 x 10 <sup>6</sup>
LB14	No crecieron colonias
LB15	No crecieron colonias
LB16	No crecieron colonias
LB17	No crecieron colonias

Tabla 3. Promedio del efecto de los *Lactobacillus* spp. sobre el crecimiento de *A. apis* (mm).

Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	Diámetro de crecimiento de <i>A. apis</i> (mm)
LB2	0
LB3	1,7 ± 0,158
LB4	2,08 ± 0,19
LB5	1,5 ± 0,23
LB6	0
LB7	82,4 ± 0,65
LB8	83,94 ± 0,98
LB10	82,82 ± 0,75
LB11	83,28 ± 0,97
LB13	2,26 ± 0,85
Control	88,1 ± 1,42

Este procedimiento es fundamental, debido a que las bacterias probióticas pueden portar genes de resistencia a antibióticos, y transferirlos a las bacterias patógenas que se vuelven resistentes a los antibióticos (Sharma *et al.*, 2014).

La actividad hemolítica de las 10 cepas evaluadas en las 24, 48 y 72 h indicó ausencia de halos transparentes alrededor de cada una de ellas, lo que demostró que no generaron lisis de los glóbulos rojos. Esto debido a que algunos microorganismos presentan la capacidad de lisar las paredes de los glóbulos rojos al secretar toxinas como alfa-toxinas,

y no son considerados como potenciales probióticos (FAO/OMS 2002).

La prueba de antagonismo se realizó con las 10 bacterias contra *A. apis* LSAPJuy (MH633693), donde se registraron diferentes promedios de efectos de los *Lactobacillus* sobre la colonia fúngica (Tabla 3).

Las cepas LB3, LB4, LB5 y LB13 se destacaron con promedios bajos de diámetros de crecimiento del hongo, y no presentaron esporulación en los 14 días de incubación. Por otra parte, LB2 y LB6 lograron inhibir el crecimiento fúngico en los días de incubación.

El análisis estadístico determinó diferencia significativa con un p valor < 0,0001, entre los diversos tratamientos con las bacterias lácticas contra *A. apis* (Figura 1).

Se observó que las cepas LB2 y LB6 presentaron mayor efecto antagonístico frente al hongo, seguidas

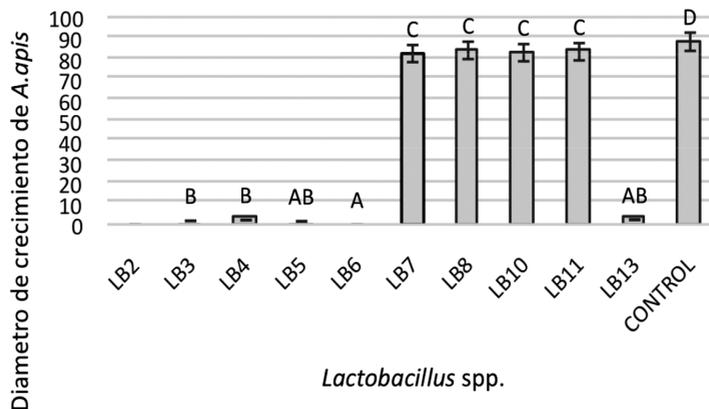


Figura 1. Diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. y su efecto en la colonia de *A. apis*.

por LB13 y LB5 estadísticamente iguales entre ellas, y por LB3 y LB4, mientras que las demás bacterias no lograron generar efecto inhibitor. Este comportamiento se relacionó con la presencia de compuesto antimicrobiano, lo cual concuerda con lo expuesto por Le Lay *et al.* (2016), quienes señalaron que las bacterias lácticas presentan una interacción compleja de compuestos. Entre estos se encuentran ácidos grasos, ácidos orgánicos, compuestos proteicos, ácidos fenólicos, peróxidos de hidrógeno, reuterina, que generan efectos antagonicos frente al patógeno.

Este último ensayo permitió seleccionar las cepas LB6, LB2, LB5, LB3, LB4, LB13, que mostraron mejor efecto inhibitor sobre la colonia fúngica. De las seis bacterias se identificaron repeticiones genéticas, cuyas secuenciaciones se depositaron en las bases de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las cepas LB2 y LB6 correspondieron a *Lactobacillus kunkeei* cuyo número de acceso fue LSJ (MF435935). Las cepas LB13 y LB4 incluyeron a *Lactobacillus melliventris* acceso LSAM (MF435936), y LB3 y LB5 a *Lactobacillus helsingborgensis* número de acceso LSAI (MF435934), con 100% de identidad con otras cepas de la base de datos GenBank (NCBI). Cabe destacar que al realizar el análisis filogenético de estas bacterias presentaron un cladomonofilético aislado de las bacterias obtenidas del intestino de abejas (Tejerina *et al.*, 2018).

Estas 3 bacterias demostraron cumplir las pruebas para determinar su capacidad probiótica, corroborando lo expuesto por Villena y Kitazawa (2017), quienes expresaron que es fundamental que las bacterias probióticas presenten tolerancia a pH y ácidos biliares, para poder sobrevivir en el intestino.

Di Cagno *et al.* (2019) reportaron que en el consorcio de microorganismos autóctonos que se encuentran en el pan de polen, conjuntamente con las levaduras se halla en mayor cantidad *L. kunkeei*. Sin embargo, en esta investigación también se registró en ese nicho a *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*.

### Conclusión

De las muestras de pan de polen obtenidas en los diversos apiarios de *Apis mellifera*, y a partir de las pruebas para determinar bacterias con potencial probiótico, se logró identificar las siguientes cepas con capacidad probiótica: *Lactobacillus kunkeei* LSJ (MF435935), *Lactobacillus melliventris* LSAM (MF435936) y *Lactobacillus helsingborgensis* LSAI (MF435934), cuya secuenciación se depositó en la base de datos Genbank.

Por otra parte, se reportó la presencia de *L. kunkeei* en el pan de polen de las abejas *Apis mellifera*, así como de *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*.

Estos tres *Lactobacillus* se seleccionaron para ser aplicados como suplementos alimenticios y contribuir en el mejoramiento de la salud de las abejas.

### Literatura Citada

- Aronstein, K.A.; Murray, K.D.  
2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal. Invertebr. Pathol.*, 103, 20-29.
- Audisio, C.M.; Torres, M.J.; Sabate, D.C.; Ibarra, C.; Apella, M.C.  
2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res.*, 166(1): 1-13.
- Balamurugan, R.; Chandragunasekaran, A.S.; G. Chellappan, G.; Rajaram, K.; Ramamoorthi, G.; Ramakrishna, B.S.  
2014. Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *Indian J Med Res.*, 140(3): 345.
- Cariaga Martínez, A.E.; Zapata, P.D.  
2007. Laboratorio de Biología Molecular. Editorial Universitaria, Misiones, Argentina. 23-26.
- Chamba, J.F.; Duong, C.; Fazel, A.; Prost, F.  
1994. Sélection des Souches de Bactéries Lactiques. *Bactéries Lactiques.*, 1: 501-502.
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K.  
1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.*, 61 (12): 1636-1643.
- Di Cagno, R.; Pasquale, F.; Cantatore, V.; Gobbet, M.  
2019. Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiology.*, 82: 218-230.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzanini, M. G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. Versión  
2008. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO).  
2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1-11. London, Ontario, Canada.
- Gómez, N.C.  
2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Front Microbiol.*, 7: 1-15.
- González-Montiel, L.; Delgado-Bravo, C.H.; Pimentel-González, D.J.; Campos-Montiel, R.J.  
2010. Viabilidad de cepas probióticas en leche fermentada almacenada en refrigeración. Universidad de Guanajuato, XII

- Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos, México.
- Klayraung, S.; Okonogi, S.; Viernstein, H.
2008. Comparative Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from Thai Traditional Fermented Foods: Miang and Nham. *Research Journal of Biological Sciences.*, 3(9): 1119-1124.
- Le Lay, C.; Coton, E.; Le Blay, G.; Chobert, J.M.; Haertlé, T.; Choiset, Y.; Van Long, N.N.; Meslet-Cladière, L.; Mounier, J.
2016. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 239: 79-85.
- Lebeer, S.; Bron, P.A.; Marco, M.L.; Van Pijkeren, J.P.; Motherway, M.O.; Hill, C.; Klaenhammer, T.
2018. Identification of probiotic effector molecules: Present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49: 217-223.
- Monteagudo, A.; Rodríguez, L.; Rúa, J.; Martínez, H.; Navasa, N.; García, M.; Ferrero, M.
2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4: 531-54.
- Moreno Galarza, L.J.
2012. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Posgrado Interfacultades de Microbiología Bogotá, Colombia.
- Raymann, K.; Shaffer, Z.; Moran, N.A.
2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol.*, 15 e2001861.
- Reynaldi, F.J.; Lucía, M.; Genchi García, M.L.
2015. *Ascospaera apis*, the entomopathogenic fungus affecting larvae of native bees *Xylocopa augusti*. *Revista Iberoamericana de Micología.*, 32: 261-264.
- Sharma, P.; Tomar, S.K.; Goswami, P.; Sangwan, V.; Singh, R.
2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Res. Int.*, 57: 176-95.
- Tejerina, M.R.; Cabana, M.J.; Carrillo, L.; Benítez-Ahrendts, M.R.
2018. Effect of Lactic Bacteria on *Ascospaera apis* and *A. atra*. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 6 (4): 123-128.
- Tejerina, M.R.; Benítez-Ahrendts, M.R.; Audisio, M.C.
2020. *Lactobacillus salivarius* A3iob Reduces the Incidence of *Varroa destructor* and *Nosema Spp.* in Commercial Apiaries Located in the Northwest of Argentina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09638-7>
- Vásquez, A.; Olofsson, T.C.
2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apicult. Res.*, 48:189-195.
- Villena, J. y Kitazawa, H.
2017. Probiotic microorganisms: a closer look. *Microorganisms* 5: 17-28.
- Wang, C.; Cui, Y.; Qu, X.
2017. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch. Microbiol.*, 200(2): 195-201.
- Yadav, R.; Puniya, A.K.; Shukla, P.
2016. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage raabadi. *Frontiers in Microbiology.*, 7: 1683. doi: 10.3389/fmicb.2016.0168

