

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICA PRODUCTORAS DE RIBOFLAVINA FRENTE A PATÓGENOS DE *Apis mellifera*

INHIBITORY ACTIVITY OF RIBOFLAVIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA AGAINST PATHOGENS OF *Apis mellifera*

Cabana, M. J.^{1*}, LeBlanc, J. G. J.² y Benítez Ahrendts, M. R.^{1,3}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy, Alberdi 47, San Salvador de Jujuy, Provincia de Jujuy, Argentina

² CERELA-CONICET-FML-FECIC, Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Provincia de Tucumán, Argentina

³ Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA-CONICET), Provincia de Jujuy, Argentina

*Autor para correspondencia:
mariajosecabana@fca.unju.edu.ar

Período de Publicación:
Diciembre 2025

Historial:
Recibido: 09-09-25
Aceptado: 21-11-25

RESUMEN

Ascosphaera (A.) apis y *Paenibacillus (P.) larvae* son patógenos que afectan la microbiota intestinal de las larvas de *Apis mellifera*, generando estrés oxidativo y elevada mortalidad, lo que representa un desafío para la sanidad apícola. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de bacterias lácticas (BL) probióticas y su capacidad de producir riboflavina (B₂), considerando su potencial aplicación en la salud intestinal larval. A partir del polen se aislaron tres cepas correspondientes a: *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus melliventris*. Ajustadas a 10⁸ UFC/mL, se evaluó su actividad inhibitoria en dos modalidades: como cultivo bacteriano (CB) y como sobrenadante libre de célula (SLC). Para *A. apis*, se inocularon 20 µL de los CB o SCL sobre medio MY20, se incubaron 30°C por 7 días y se midió el diámetro del crecimiento fúngico. En el caso de *P. larvae*, se aplicaron 25 µL de los CB o SCL en orificios realizados en medio MYPG inoculado con 20 µL del patógeno, se incubó a 37°C por 24h y se registraron los halos de inhibición. La producción de riboflavina se determinó mediante el cultivo de las BL en medio CDM sin riboflavina a 37°C por 24h se observó turbidez como indicador de síntesis. Los datos se analizaron mediante ANOVA y test de Tukey (p<0,0001). Los resultados mostraron que tanto el CB como el SCL de las tres cepas ejercieron inhibición a ambos patógenos. Se destacó que el CB de *A. kunkeei* logró controlar más del 90% de *A. apis* y presentar una inhibición elevada frente a *P. larvae*. Así mismo, todas las cepas evaluadas produjeron riboflavina, lo que resalta su potencial funcional. En conclusión, *A. kunkeei* se perfila como biocontrolador eficaz, capaz de contribuir a la homeostasis intestinal de las larvas mediante la producción de riboflavina y presentar una estrategia prometedora para la sanidad apícola.

Palabras clave: biocontrolador, lactobacilos, patógenos

SUMMARY

Ascosphaera apis and *Paenibacillus larvae* are pathogens that disrupt the gut microbiota of *Apis mellifera* larvae, causing oxidative stress and high mortality, thus posing a major challenge for beekeeping health. This study aimed to evaluate the *in vitro* inhibitory effect of probiotic lactic acid bacteria (LAB) and their ability to produce riboflavin (B2), considering their potential application to improve larval gut health. Three strains were isolated from pollen and identified as *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, and *Lactobacillus melliventris*. Adjusted to 10^8 CFU/mL, their inhibitory activity was tested in two ways: bacterial culture (CB) and cell-free supernatant (SLC). For *A. apis*, 20 μ L of CB or SLC were inoculated onto MY20 medium, incubated at 37 °C for 7 days, and fungal growth diameter was measured. For *P. larvae*, 25 μ L of CB or SLC were applied into wells made in MYPG medium inoculated with 20 μ L of the pathogen, followed by incubation at 37 °C for 24 h and measurement of inhibition halos. Riboflavin production was assessed by cultivating LAB in CDM medium without riboflavin at 37 °C for 24 h, with turbidity used as an indicator of synthesis. Data were analyzed using ANOVA and Tukey's test ($p < 0.0001$). Results showed that both CB and SLC from the three LAB strains significantly inhibited the pathogens. Notably, the CB of *A. kunkeei* exhibited the strongest activity, achieving over 90% inhibition of *A. apis* and high inhibition against *P. larvae*. Additionally, all strains produced riboflavin, confirming their functional potential. In conclusion, *A. kunkeei* emerges as a promising biocontrol agent, capable of contributing to larval gut homeostasis through riboflavin production and providing an innovative strategy for improving honeybee health.

Keywords: biocontrol, lactobacilli, pathogens

INTRODUCCIÓN

Las abejas (*Apis mellifera* L.) cumplen un rol fundamental en el equilibrio de los ecosistemas como en la producción agrícola (Papa *et al.*, 2022). Sin embargo, su salud y supervivencia se ven comprometidas por múltiples factores, entre los que se destacan, el uso de pesticidas y agroquímicos, el cambio climático, la presencia de patógenos y parásitos, entre otros, que en muchos casos puede ocasionar la muerte de las colonias (Goulson *et al.*, 2015).

En relación a los patógenos, una de las enfermedades relevantes es la loque americana causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*. Según Nilsson y colaboradores (2024), las abejas pueden infectarse a través de la ingestión de alimentos contaminados con esporas de *P. larvae*, que afectan principalmente a las crías, larvas y, en consecuencia a colonias enteras.

Genersch (2010) señala que la ingestión de apenas diez esporas de *P. larvae* resulta suficiente para desencadenar la infección, provocando la muerte de la pupa y larva. Una vez en el organismo, las esporas germinan en el intestino medio, donde se multiplican, atraviesan el epitelio e invaden el hemocelo de las larvas. Posteriormente, se produce la descomposición del intestino, lo que da lugar a la aparición de una masa marrón y viscosa con elevada cantidad de esporas bacterianas, favoreciendo la diseminación del patógeno dentro de la colonia.

Las larvas muertas son retiradas por las abejas nodrizas, que al limpiar las celdas incorporan de manera involuntaria las endosporas de la loque americana. Este proceso facilita la dispersión del patógeno dentro de la colonia y aumenta el riesgo de infección de las larvas restantes (Genersch, 2010). Además, Erban y colaboradores (2017) reportaron que las abejas adultas expuestas a *P. larvae* presentan alteraciones significativas en el microbioma intestinal, lo que sugiere un impacto más amplio de la enfermedad en la fisiología de la colmena.

Las colonias infectadas pueden ser tratadas con antibióticos como oxitetraciclina y tilosina (Tsourkas, 2020); sin embargo, su aplicación ha sido asociada con alteraciones en la microbiota intestinal de las abejas y con efectos adversos sobre el ambiente (Bulson *et al.*, 2021). Como alternativa, se ha propuesto el empleo de bacteriófagos, capaces de infectar y lisar específicamente a *P. larvae*, presentado una estrategia biocontroladora prometedora (Brady *et al.*, 2017).

Por otra parte, *A. mellifera* también se ve afectada por el hongo *Ascosphaera apis*, agente etiológico de la ascosferosis. La infección ocurre por la ingestión de alimentos contaminados con ascoporas, las cuales germinan dentro del intestino de las larvas, provocando un proceso de momificación. El resultado es la presencia de larvas secas con un aspecto blanquecino o, en estadios avanzados, marrón a negro (Aronstein *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2024).

Estudios realizados por Li y colaboradores (2020) demostraron que *A. apis* induce estrés oxidativo en larvas de abejas, lo que conlleva una disminución de la actividad enzimática de SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa) y GST (glutathión S-transferasa), enzimas claves en la protección de las células intestinales frente al daño oxidativo. De manera similar Moliné y colaboradores (2021) determinaron que *P. larvea* también promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno, generando estrés oxidativo y afectando particularmente la actividad de la enzima GST.

En relación al control de ascosferosis, hasta al momento no se han registrado tratamientos terapéuticos eficaces que sean, al mismo tiempo, seguros y respetuosos con el ambiente. Algunas de las estrategias exploradas incluyen modificaciones genéticas en el moho para reducir su capacidad de infección (Aynalem *et al.*, 2022), y el uso de agentes biocontroladores, como extractos de plantas con propiedades antifúngicas (Krutmuang *et al.*, 2022).

Una alternativa para el control de estas enfermedades es el uso de bacterias lácticas (BL) con propiedades probióticas, definidas como microorganismos vivos, que al ser administrados, confieren beneficios a la salud del hospedador mediante la mejora y restauración de la microbiota intestinal (Thorakkattu *et al.*, 2022).

Diversos estudios han demostrado el potencial de estas bacterias frente a patógenos apícolas. Iorizzo y colaboradores (2020, 2021) reportaron el efecto inhibitorio *in vitro* de *Apilactobacillus kunkeei* y *Lactobacillus plantarum* sobre *A. apis*. De manera complementaria Ye y colaboradores (2021) destacaron la relevancia de la abundancia de *Lactobacillus* en la microbiota intestinal de las abejas, ya que su presencia contribuye a disminuir la infección causada por este hongo.

En relación con *P. larvae*, investigaciones recientes por Truong y colaboradores (2023) evidenciaron que *L. apis* HSY8_B25, *L. panisapium* PKH2_L3 y *L. melliventris* HSY3_B5 ejercen un efecto significativo en la inhibición del desarrollo del patógeno.

Así mismo, se han llevado a cabo ensayos utilizando tanto el cultivo bacteriano (CB) como el sobrenadante libre de célula (SLC) de diferentes cepas de BL, obteniéndose resultados variables en su capacidad inhibitoria frente *A. apis* y *P. larvae* (Iorizzo *et al.*, 2021; Nilsson *et al.*, 2024; Babrud *et al.*, 2019).

Cabe destacar que el efecto inhibitorio de las bacterias lácticas (BL) se asocia a la producción conjunta de diversos compuestos bioactivos, tales como, proteínas, péptidos, ácidos grasos, ácidos orgánicos y peróxidos de hidrogeno (Berríos *et al.*, 2018). Dentro de estos metabolitos se incluyen vitaminas del complejo B (LeBlanc *et al.*, 2011), entre las que sobresale la riboflavina (vitamina B₂), fundamental para la homeostasis celular al ser, precursora del mononucleótido de flavina (FMN) y del dinucleótido de flavina adenina (FAD), cofactores indispensables en reacciones de metabolismo redox (Lei *et al.*, 2021). Entre los beneficios atribuidos a la riboflavina se encuentran la prevención del daño oxidativo, la reducción de procesos inflamatorios y la modulación favorable de la microbiota intestinal (Zhu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024).

En este contexto, la microbiota intestinal de las abejas adquiere un papel central en la regulación en la salud de la colonia. La incorporación de cepas probióticas como parte de las prácticas apícolas se presenta como una alternativa segura y prometedora frente a los métodos convencionales basados en antibióticos o antifúngicos, los cuales pueden generar efectos adversos tanto en el organismo de las abejas como en el ambiente. Así el uso de BL con propiedades probióticas se proyecta como una estrategia sostenible para reforzar la salud intestinal, mejorar la resistencia frente a patógenos y, en consecuencia, contribuir al bienestar y productividad de las colmenas (Abdi *et al.*, 2023).

Es por ello que, el laboratorio de Sanidad Apícola y Meliponícola de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu, se seleccionaron tres bacterias lácticas aisladas del polen conservado con potencial probiótico: *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ), *Lactobacillus melliventris* (LSAI) y *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAM) (Cabana *et al.*, 2021). A partir de esta selección, surgieron los siguientes interrogantes: ¿Estas bacterias lácticas son capaces de afectar el crecimiento *in vitro* de cepas de *A. apis* y *P. larvae*?, y además, ¿Pueden producir riboflavina, contribuyendo con ello – junto a otros metabolitos – a la homeostasis intestinal de las abejas?

En este marco, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de *Apilactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus melliventris* tanto en su forma de cultivo bacteriano (CB) como en su sobrenadante libre de célula (SLC) sobre dos cepas de *A. apis* y una de *P. larvae*. Así mismo, se propuso determinar la capacidad de producción de riboflavina por parte de dichas cepas de bacterias lácticas, considerando el potencial aporte de este compuesto bioactivo a la salud intestinal y al fortalecimiento del sistema defensivo de las abejas.

MATERIAL Y MÉTODO

Activación de las bacterias lácticas

Para la obtención de los cultivos bacterianos (CB), las cepas lácticas fueron activadas en 5 mL de caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) e incubadas durante 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia, hasta alcanzar una concentración aproximada de 10⁸ UFC/mL.

En el caso del sobrenadante libre de célula (SLC), las BL fueron activadas en las mismas condiciones descriptas anteriormente. Transcurrido las 24 h de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 6000 x g por 5 min, recuperándose el sobrenadante libre de células, que fue utilizado para los ensayos posteriores.

Ensayo de inhibición contra *A. apis*

Las cepas fúngicas utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el Laboratorio de Sanidad Apícola y Meliponícola (Facultad de Ciencias Agrarias- Universidad Nacional de Jujuy). Dichas cepas fueron aisladas a partir de pólenes comerciales de Argentina, identificadas genéticamente y depositadas en base GenBank (NCBI) con los siguientes números de acceso: *Ascosphaera apis* LSAPPER (MH633695) de Entre Ríos y *Ascosphaera apis* LSAPPMis (MH633694) de Misiones. Ambas cepas se conservaron a 4°C en

medio de cultivo agarizado MY20 (Takatori & Tanaka, 1982).

Para los ensayos de inhibición, se depositaron 25 µL de cada cultivo bacteriano (CB) o de su sobrenadante libre de células (SCL) sobre placas de medio MY20 agarizado, distribuyéndose el inóculo con espátula de Drigalsky. En el centro de cada placa se colocó un disco de 7 mm de diámetro de cultivo fúngico, obtenido mediante un sacabocado a partir cultivos mixtos de cepas de polaridad sexual opuesta. Las placas se incubaron a 30 °C en condiciones de microaerofilia por 7 días. Como controles, se prepararon placas inoculadas únicamente con las cepas fúngicas.

Transcurrido 7 días de incubación, se evaluó el crecimiento fúngico mediante la observación del aspecto colonial y la medición del diámetro en los controles y en los tratamientos. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado para cada cepa bacteriana.

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó empleando la siguiente formula de Iorizzo *et al.*, (2020):

$$\% I = [1 - (D_s / D_c)] \times 100. I \%:$$

Donde D_s corresponde al diámetro de las hifas tratadas y D_c al diámetro de las hifas en los controles.

Ensayo de inhibición contra *P. larvae*

La cepa de *P. larvae* utilizada en este estudio fue cedida por el laboratorio de Sanidad Apícola de la Facultad de Ciencias Agrarias-Unju. El patógeno se reactivó en 10 mL de caldo MYPGP a 37°C durante 16 h en condiciones de microaerofilia, siguiendo el protocolo descripto por Forsgren y Laugen (2014).

Para evaluar el efecto inhibitorio de las bacterias lácticas, se empleó la técnica de difusión en placa (Reis *et al.*, 2016). Esta consistió en suspender 20 µL del patógeno ajustada a una concentración de 1×10^7 UFC/mL sobre placas de Petri estériles, a las que posteriormente se les vertió medio MYPGP agarizado. Una vez solidificado el medio de cultivo, se realizaron orificios de 5 mm de diámetro utilizando un sacabocado estéril.

En cada orificio se depositaron 25 µL de cada cultivo bacteriano (CB) o de sus sobrenadantes libre de célula (SLC) de las bacterias. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado. El efecto inhibitorio se determinó por la presencia de halos transparentes alrededor de los orificios, los cuales se midieron en milímetros para cuantificar la actividad antimicrobiana.

La interpretación de los halos de inhibición se realizó siguiendo la escala propuesta por Dengiz y colaboradores (2025), clasificando el diámetro de las zonas transparentes como: inhibición débil (16-20 mm), inhibición moderada (21-24 mm), inhibición alta (25-30 mm) e inhibición fuerte (>30 mm).

Determinación de la producción de riboflavina (B2)

La determinación de riboflavina por las cepas lácticas se evaluó empleando el medio químico definido CDM (medio) descrito por Yao y colaboradores (2018), modificado mediante la exclusión de riboflavina en su composición.

Las cepas de lactobacilos fueron activadas durante 24 h en 5 mL de caldo MRS a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 6000 x.g durante 15 min. Los sobrenadantes fueron descartados y los sedimentos celulares se lavaron 3 veces con solución salina estéril al 0,85%. Posteriormente los *pellets* bacterianos se resuspendieron en un volumen

equivalente al cultivo original para estandarizar la concentración celular.

Cada suspensión bacteriana se inoculó al 2 % (v/v) en tubos que contenían el medio de cultivo CDM. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. Al finalizar el período de incubación, se evaluó la presencia o ausencia de turbidez visible como indicador del crecimiento bacteriano dependiente de la síntesis endógena de riboflavina. Cada ensayo se realizó en siete repeticiones para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software estadístico INFOSTAT (versión 2023). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar (DE). Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) bajo un diseño completamente al azar (DCA) para evaluar diferencias estadísticas entre tratamientos. Cuando se detectaron diferencias estadísticas se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para la separación de medias, siguiendo el criterio descripto por Di Rienzo y colaboradores (2011).

RESULTADOS

Inhibición de los CB y el SLC de bacterias lácticas contra A. apis

Se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico mediante la aplicación de los cultivos bacterianos (CB) y los sobrenadantes libres de célula (SLC) de las bacterias lácticas (Tabla 1). Todas las cepas analizadas mostraron actividad inhibitoria frente las dos cepas de A. apis (LSAPPMis y LSAPPER), con porcentajes de inhibición que oscilaron entre un 43 a un 95%.

Tabla 1: Porcentaje de inhibición (media ± DE) de las matrices cultivo bacteriano (CB) y sobrenadante libre de célula (SLC) de las bacterias lácticas sobre la expansión radial de hongos de A. apis (LSAPPMis-LSAPPER)

		Porcentaje de inhibición (media ± DE)	
Bacterias lácticas	Matriz	A. apis (LSAPPMis)	A. apis (LSAPPER)
A. kunkeei	CB	95,0 ± 0,4	90,0 ± 0,7
	SLC	73,0 ± 2,0	59,0 ± 2,0
L. helsingborgensis	CB	93,0 ± 2,0	67,0 ± 2,0
	SLC	68,0 ± 2,0	54,0 ± 4,0
L. melliventris	CB	90,0 ± 1,0	62,0 ± 2,0
	SLC	43,0 ± 3,0	43,0 ± 3,0

El análisis estadístico evidenció diferencia significativa (p <0,0001) entre tratamientos. El test de tukey indicó que los cultivos bacterianos (CB) presentaron una actividad antifúngica significativamente superior a los sobrenadantes libre de células (SLC). Entre las cepas evaluadas el CB de A. kunkeei mostró la mayor inhibición del crecimiento fúngico, alcanzando un 95 % de control sobre A. apis LSAPPMis, seguida por L. helsingborgensis y L. melliventris.

Aunque los SLC de las BL también presentaron actividad antifúngica sobre *A. apis*, su efecto fue menor en comparación con los CB. Entre ellos, el sobrenadante de *A. kunkeei* resultó más eficaz, seguido por el de *L. helsingborgensis*, y en último lugar, el de *L. melliventris*. (Fig.1).

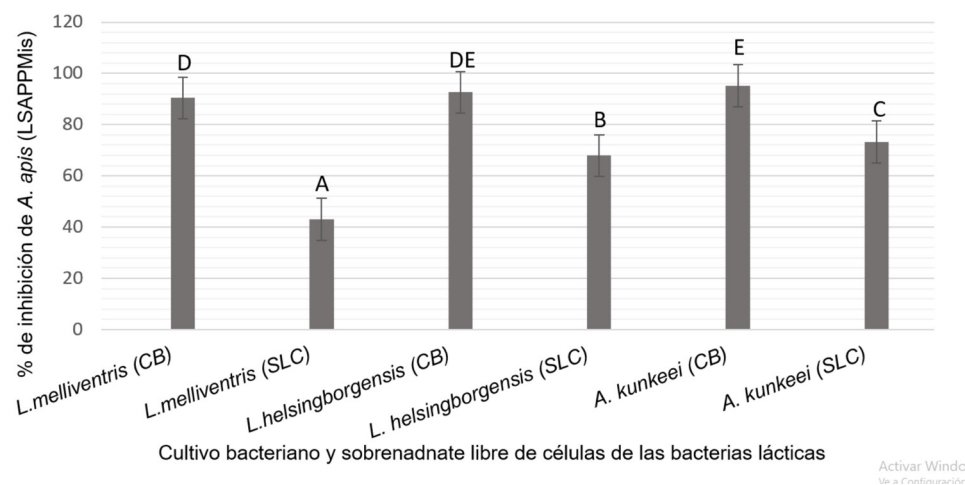


Figura 1: Efecto inhibitorio sobre el desarrollo del hongo *A. apis* (LSAPPMis) ejercidos por cultivos bacterianos (CB) y sobrenadantes libres de célula (SLC) de las cepas lácticas *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris*. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; prueba de Tukey).

En relación a *A. apis* (LSAPPER), el análisis estadístico mostró diferencia significativa en el efecto inhibitorio de las cepas evaluadas ($p < 0,0001$). El test de Tukey evidenció variaciones en la acción de los cultivos bacterianos (CB) y los sobrenadantes libres de célula (SLC). El CB de la cepa *A. kunkeei*, presentó la mayor inhibición significativa sobre el desarrollo del hongo, seguido por el CB de *L. helsingborgensis*. En cambio, el CB de *L. melliventris* y SLC de *L. helsingborgensis* no mostraron diferencias estadísticas entre sí.

Todas los SLC demostraron capacidad antifúngica, destacándose *A. kunkeei*, seguido por *L. helsingborgensis*. Sin embargo, el CB de *A. kunkeei* alcanzó el mayor promedio de inhibición, logrando aproximadamente un 90% del control del crecimiento de *A. apis* (LSAPPER) (Fig 2).

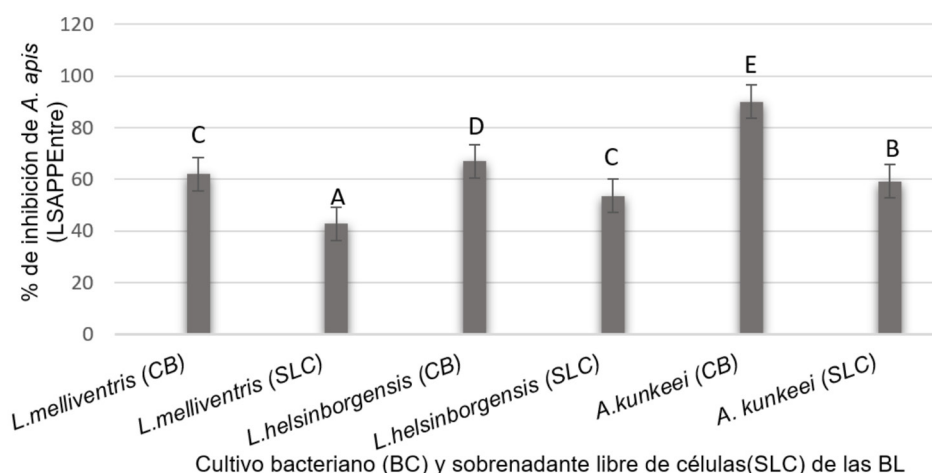


Figura 2: Efecto inhibitorio ejercido por los cultivos bacterianos (CB) y sobrenadantes libres de células (SLC) de las cepas lácticas *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* y *L. melliventris* sobre el desarrollo del hongo *A. apis* (LSAPPEntre). Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$; prueba de Tukey).

Inhibición de los CB y el SLC de bacterias lácticas contra *P. larvae*

Se registraron las zonas de inhibición obtenidas a partir de los CB y los SLC de las cepas lácticas frente *P. larvae* clasificadas según la escala propuesta por Dengiz y colaboradores (2025) y expresadas con sus respectivas desviaciones estándar (Tabla 2). Se observó una inhibición alta del cultivo bacteriano (CB) de *A. kunkeei*, seguido por *L. helsingborgensis*, que presentó un efecto moderado. En contraste, los SLC de las tres cepas lácticas generaron únicamente zonas de inhibición débil.

Tabla 2: Zonas de inhibición obtenidas sobre *P. larvea* por cultivo bacteriano (CB) y sobrenadante libre de célula (SLC) de cepas lácticas, clasificadas según los criterios de Dengiz y colaboradores (2025).

Bacterias lácticas	Matrices	diámetro de inhibición de <i>P. larvae</i> (media ± DE)	Clasificación de zona de inhibición
<i>A. kunkeei</i>	CB	29,0 ± 0,8	alta
	SLC	18,0 ± 0,4	débil
<i>L. helsingborgensis</i>	CB	23,0 ± 0.9	moderada
	SLC	13,0 ± 0,8	débil
<i>L. melliventris</i>	CB	17,0 ± 0,6	débil
	SLC	10,0 ± 0,4	débil

El análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas en el efecto inhibitorio de las cepas láctica frente a *P. larvae* (p<0,0001). El test de tukey reveló que el CB de *A. kunkeei* presentó el mayor efecto de inhibitorio sobre el crecimiento de *P. larvae*, seguido por *L. helsingborgensis* aunque con un menor impacto. En cambio, *L. melliventris* y la SLC de *A. kunkeei* no mostraron diferencias significativas entre sí. Por su parte, los SCL de *L. melliventris* y *L. helsingborgensis* fueron los que exhibieron la menor actividad inhibitoria sobre el patógeno (Fig.3).

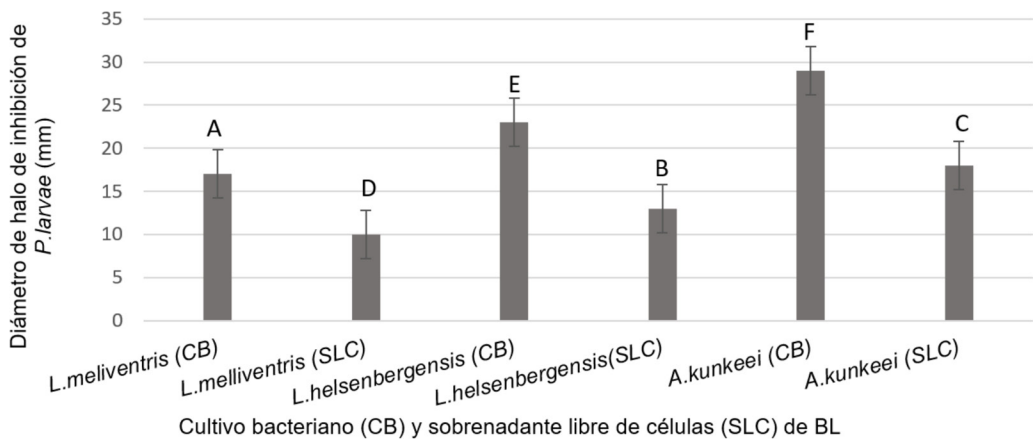


Figura 3: Efecto inhibitorio ejercido por los cultivos bacterianos (CB) y sobrenadantes libres de células (SLC) de *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* sobre el desarrollo de *P. larvae*. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05; prueba de Tukey).

Producción de riboflavina de las bacterias lácticas

Las cepas *A. kunkeei*, *L. melliventris* y *L. helsingborgensis* mostraron la capacidad para producir turbidez en el medio de cultivo definido (CDM) carente de riboflavina, en las siete repeticiones realizadas. Estos resultados evidencian que las tres cepas lácticas poseen la capacidad de sintetizar vitamina B₂, lo que podría contribuir a la homeostasis intestinal y a los efectos probióticos observados en estudios previos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que tanto los cultivos bacterianos (CB) y sobrenadantes libres de célula (SLC) de las bacterias lácticas evaluadas ejercen control sobre *Ascospaera apis* y *Paenibacillus larvae*. Se observó que los CB presentaron mayor efecto inhibitorio, tanto antibacteriano y como antifúngico, en comparación con sus SLC, destacando especialmente el CB de *A. kunkeei*.

El efecto de los CB podría explicarse por la competencia por espacio y nutrientes, así como por la acción de componentes generados de la pared celular que producen actividad antimicrobiana, tal como reportaron Iorizzo y colaboradores (2020). Además, Bazukyan & colaboradores (2018) señalaron que proteínas activas, como proteinasas, contribuyen a la actividad antibacteriana y antifúngica. Åvall-Jääskeläinen & Palva (2005) y Janashia & colaboradores (2018), indicaron que proteínas glucolíticas y ribosómicas presentes en la superficie de las células pueden formar biopelículas y ejercer funciones antimicrobianas.

En cuanto a los SLC, su efecto inhibitorio se relaciona con la producción de metabolitos secundarios, incluyendo ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, butírico, propiónico), bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, lisozima, CO₂ y diacetilo, que actúan de manera individual o sinérgica para inhibir el crecimiento de los patógenos (Cirat et al., 2024). Las diferencias observadas entre las cepas se deben a la variabilidad intraespecífica de las bacterias lácticas, concordando con Mishra & Acharya (2021) y Dengiz et al., (2025).

La mayor actividad de *A. kunkeei* puede atribuirse a la sinergia entre varios compuestos que son extracelulares como intercelulares, que potencia su efecto antimicrobiano y antifúngico (Iorizzo et al., 2021).

Por otro lado, *P. larvae* y *A. apis* generan estrés oxidativo en la microbiota intestinal disminuyendo la actividad de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y GST (Li et al., 2020; Zhang et al., 2023; Moliné et al., 2024). La producción de riboflavina por las bacterias lácticas podría mitigar estos efectos al favorecer la actividad de dichas enzimas y estabilizar la capacidad antioxidante del intestino (Suwannasom et al., 2020). Asimismo, la riboflavina contribuye a la síntesis de butirato mediante la enzima butiril-CoA deshidrogenasa, ejerciendo efectos antiinflamatorios y manteniendo la integridad de la barrera intestinal (Liu et al., 2023).

En nuestros ensayos, se determinó que las BL producen riboflavina, la cual podría influir en la regulación de la especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas por *A. apis* y *P. larvae* en la microbiota intestinal, contribuyendo a disminuir el estrés oxidativo. Estos resultados coinciden con lo reportado por Suwannasom y colaboradores (2020), quienes demostraron que la riboflavina modula las concentraciones y la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutación peroxidasa (GPx), favoreciendo su función y fortaleciendo la capacidad antioxidante de la microbiota intestinal y beneficiando la salud.

Asimismo, la riboflavina podría contribuir a la microbiota intestinal y a la salud de las abejas frente a estos patógenos y otros factores que afecten su salud mediante la producción de la enzima butiril-CoA deshidrogenasa, que actúa como cofactor para la producción de butirato (ácido graso de cadenas cortas) en el intestino, generando efectos antiinflamatorios, manteniendo la permeabilidad de la barrera

intestinal (Liu *et al.*, 2023).

Los resultados mostraron que las tres cepas lácticas presentaron un mayor efecto inhibitorio en su forma de cultivo bacteriano (CB) frente a los patógenos, en comparación con sus sobrenadantes libres de célula (SLC), lo que sugiere que estas cepas podrían ser más efectivas cuando se emplean como CB. En particular, *A. kunkeei* mostró un potencial destacado para modular la microbiota intestinal y preservar la salud de *A. mellifera*. Esto coincide con lo señalado por Motta & Moran (2024), quienes destacaron que la protección de la microbiota intestinal de las abejas es fundamental para regular su entorno intestinal, reforzar la defensa frente patógenos y favorecer procesos como la digestión, la desintoxicación y la función del sistema inmunológico.

CONCLUSIÓN

Esta investigación demostró que *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* y *A. kunkeei* ejercieron un efecto inhibitorio, tanto en su forma de cultivo bacteriano (CB) como en sus sobrenadantes libres de célula (SLC) frente a cepas de *A. apis* y *P. larvae*. Asimismo, se confirmó que las tres cepas son capaces de producir riboflavina. Sin embargo, el mayor efecto antibacteriano y antifúngico se observó en *A. kunkeei*, en su estado de cultivo bacteriano (CB), lo que la posiciona como una cepa con alto potencial para el biocontrol de patógenos y para contribuir a la protección y el fortalecimiento de la salud de las abejas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdi, K., Said, M.B., Crotti, E.; Masmoudi, A.S., & Cherif, A. (2023). The promise of probiotics in honeybee health and disease management. *Arq. Microbiol*, 205 (2):73.
- Aronstein, K. A., Murray, K. D., & Saldivar, E. (2010). Transcriptional responses in honey bee larvae infected with chalkbrood fungus. *BMC Genomics*, 11(1):391.
- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev*, (29): 511–529.
- Aynalem, T., Meng, L., Getachew, A., Wu, J., Yu, H., Tan, J., & Li, N. (2022). La mutación del gen StcU-2 a través de CRISPR/Cas9 conduce a una mala regulación de la formación de quistes de esporas en *Ascosphaera apis*. *Microorganismos*, (10),10:2088.
- Babrud, B. R., Kermanshahi, K.R., Sede, M. F., & Moosavinejad, S.Z. (2019). El efecto del sobrenadante libre de células de *Lactobacillus reuteri* sobre el crecimiento y la formación de biopelículas de larvas de *Paenibacillus*. *J Vet Res*, 20(3):192-198.
- Bazukyan, I., Matevosyan, L., Toplaghaltsyan, A., & Trchounian, A. (2018). Antifungal activity of lactobacilli isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature. *AMB Express*, 8 (1): 87
- Berríos, P., Fuentes, J.A., Salas, D., Carreño, A., Aldea, P., Fernandez, F., & Trombert, A.N. (2018). Efecto inhibitorio de las cepas de *Lactobacillus kunkeei* formadoras de biopelícula contra *Pseudomonas aeruginosa* virulenta in vitro y en modelo de infección por polilla del panal (*Galleria mellonella*). *Beneficio. Microbios*, (9): 257–268.
- Brady, T.S., Merrill, B.D., Hilton, J.A., Payne, A.M., Stephenson, M.B., & Hope, S. (2017). Bacteriophages as an alternative to conventional antibiotic use for the prevention or treatment of *Paenibacillus* larvae in honeybee hives. *J. Invertir. Pathol*, (150):94–100.

- Bulson, L., Becher, M.A., McKinley, T.J., & Wilfert, L. (2021). Long-term effects of antibiotic treatments on honeybee colony fitness: A modelling approach. *J Appl Ecol*, 58(1):70–9.
- Cabana, M., Tejerina, M., José, J., Castro, R., & Benítez Ahrendts, M.R. (2021). Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*. *Idesia* (Arica), 39(1) 45-51.
- Cirat, R., Capozzi, V., Benmechernene, Z., Spano, G., Grieco, F., & Fragasso, M. (2024). LAB Antagonistic Activities and Their Significance in Food Biotechnology: Molecular Mechanisms, Food Targets, and Other Related Traits of Interest. *Fermentación*, 10 (4), 222
- Dengiz, B., Asesino, J., Havlík, J., Dobeš, P., & Hyršl, P. (2025). Selection of Probiotics for Honey Bees: The In Vitro Inhibition of *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, and *Serratia marcescens* Strain Sicaria by Host-Specific Lactobacilli and Bifidobacteria. *Microorganismos*, 13 (5): 1159.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, L., González Tablada, M., & Robledo, C.W. (2011). Grupo INFOSTAT. FCA. Universidad Nacional de Córdoba.
- Erban, T., Ledvinka, O., Kamler, M., Nesvorna, M., Hortova, B., Tyl, J. & Hubert, J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)-associated bacterial community affected by American foulbrood: Detection of *Paenibacillus larvae* via microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7 (1), 5084.
- Fan, X., Gao, X., Zang, H., Liu, Z., Jing, X., Liu, X., Guo, R. (2024). Transcriptional dynamics and regulatory function of miRNAs in *Ascosphaera apis* invading *Apis mellifera* larvae. *Front Microbiol*, (8); 15: 1355035.
- Forsgren, E. & Laugen, A.T. (2014). Prognostic value of using bee and hive debris samples for the detection of American foulbrood disease in honey bee colonies. *Apidologie*, (45):10–20.
- Genersch, E. (2010). American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, (103), S10–S19.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347.
- Iorizzo, M., Lombardi, S.J., Ganassi, S., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., Cristofaro, A. (2020). Actividad antagonista contra *Ascosphaera apis* y propiedades funcionales de las cepas de *Lactobacillus Kunkei*. *Antibióticos*, 9 (5):262.
- Iorizzo, M., Testa, B., Ganassi, S., Lombardi, S.J., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Coppola, R. (2021) Propiedades probióticas y potencialidad de las cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* para el control biológico de la enfermedad de la loque de tiza. *J. Hongos*, 7 (5):379.
- Janashia, I., Choiset, Y., Jozefiak, D., Déniel, F., Coton, E., Akbar, A., Haertlé, T. (2018). Beneficial Protective Role of Endogenous Lactic Acid Bacteria Against Mycotic Contamination of Honeybee Beebread. *Probiot. Antimicrobiano. Proteínas*, (10): 638–646.
- Krutmuang, P., Rajula, J., Pittarate, S., Chatima, C., Thungrabeab, M., Mekchay, S., & Senthil-Nathan, S. (2022). The inhibitory action of plant extracts on the mycelial growth of *Ascosphaera apis*, the causative agent of chalkbrood disease in Honey bee. *Toxicol. Representante*, 29 (9): 713–719.

- LeBlanc, J.G., Laiño, J.E., del Valle, M.J., Vannini, V., Van Sinderen, D., Taranto, M.P., Sesma, F. (2011). B-group vitamin production by lactic acid bacteria--current knowledge and potential applications. *J Appl Microbiol* (111): 1297–1309.
- Lei, J., Xin, C., Xiao, W., Chen, W., & Song, Z. (2021) La promesa de la riboflavina endógena y exógena en la antiinfección. *Virulencia*, 12(1):2314-2326.
- Li, Z., Hou, M., Qiu, Y., Zhao, B., Nie, H., & Su, S. (2020). Cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes y los perfiles metabolómicos en los intestinos de las larvas de abeja melífera (*Apis mellifera*) infectadas con *Ascosphaera apis*. *Insectos*, 11 (7):419.
- Liu, L., Sadaghian Sadabad, M., Gabarrini, G., Lisotto, P., Von Martels, J.Z.H., Wardill, H.R., Harmsen, H.J.M. (2023). La suplementación con riboflavina favorece la producción de butirato en ausencia de cambios macroscópicos en la composición de la microbiota intestinal. *Señal de antióxido redox*, 38 (4-6):282-297.
- Mishra, S. & Acharya, S. (2021). A Brief Overview on Probiotics: The Health Friendly Microbes. *Biomed Pharmacol J* 14(4):1869-1880.
- Moliné, M.P., Aguirre, M.E., Domínguez, E., Moran Giardini, P., Fernández & Gende, L.B. (2024). Short communication: Ascorbyl/ascorbate ratio as a marker of oxidative stress in larvae (*Apis mellifera*) exposed to *Paenibacillus larvae*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 269: 110896.
- Motta, E.V.S & Moran, N.A. (2024). La microbiota de las abejas melíferas y su impacto en la salud y la enfermedad. *Nat Rev Microbiol*, 22(3):122-137.
- Nilsson, A., D'Alvise, P., Milbrath, M.O., & Forsgren, E. (2024). Lactic acid bacteria in Swedish honey bees during outbreaks of American foulbrood. *Ecol Evol*, 14(2):10964.
- Papa, G., Maier, R., Durazzo, A., Lucarini, M., Karabagias, I.K., Plutino, M., Laugen Negri, I. (2022). La abeja melífera *Apis mellifera*: Un insecto en la interfaz entre la salud humana y la del ecosistema. *Biología (Basilea)*, 11(2):233.
- Reis, N. A., Saraiva, M. A. F., Duarte, E. A. A., Carvalho, E. A., Vieira, B. B., & Evangelista-Barreto, N. S. (2016). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3):811–820
- Suwannasom, N., Kao, I., Pruß, A., Georgieva, R., & Bäumlér, H. (2020). Riboflavin: The Health Benefits of a Forgotten Natural Vitamin. *Int J Mol Sci*, 21(3):950.
- Takatori, K. and Tanaka, I. (1982). *Ascosphaera apis* isolated from chalkbrood in honey bees. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, (2): 89-92.
- Thorakkattu, P., Khanashyam, A.C., Shah, K., Babu, K.S., Mundanat, A.S., Deliephan, A., & Nirmal, N.P. (2022). Postbióticos: Tendencias actuales en la industria alimentaria y farmacéutica. *Alimentos*, 11(19):3094.
- Truong, A.T., Kang, J.E., Yoo, M.S., Nguyen, T.T., Youn, S.Y., Yoon, S.S., & Cho, Y.S. (2023). Probiotic candidates for controlling *Paenibacillus larvae*, a causative agent of American foulbrood disease in honey bee. *BMC Microbiol*, 23(1):150.
- Tsourkas, P.K. (2020). *Paenibacillus larvae* bacteriophages: obscure past, promising future. *Genoma Microb*, 6(2): E000329.

- Yao, C., Chou, J., Wang, T., Zhao, H., & Zhang, B. (2018). Pantothenic Acid, Vitamin C, and Biotin Play Important Roles in the Growth of *Lactobacillus helveticus*. *Front. Microbiol*, 9:1194.
- Ye, M.H., Fan, S.H., Li, X. Y., Tarekul, I.M., Yan, C.X., Wei, W.H., & Zhou; B. (2021). Microbiota dysbiosis in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with brood diseases and foraging bees exposed to agrochemicals. *R. Soc. Open Sci*, 8 (1): 201805.
- Zhang, K., Fu, Z., Ventilador, X., Wang, Z., Wang, S., Guo, S. & Gao, X. (2023). Effect of *Ascosphaera apis* Infestation on the Activities of Four Antioxidant Enzymes in Asian Honey Bee Larval Guts. *Antioxidantes*, 12 (1): 206.
- Zhang, W.W., Thakur, K., Zhang, J.G., & Wei, Z.J. (2024). Riboflavin ameliorates intestinal inflammation via immune modulation and alterations of gut microbiota homeostasis in DSS-colitis C57BL/6 mice. *Funct de Alimentos*, (15): 4109–4121.
- Zhu, Y.Y., Thakur, K., Feng, J.Y., Zhang, J.G, Hu, F., Céspedes-Acuña, C.L. & Nirmal, N.P. Wei, Z.J. (2022). Riboflavin Bioenriched Soymilk Alleviates Oxidative Stress Mediated Liver Injury, Intestinal Inflammation, and Gut Microbiota Modification in B₂ Depletion-Repletion Mice. *J Agric Food Chem*, (70): 3818–3831.

Agraria