



Caracterización parcial de la actividad probiótica de bacterias ácido lácticas aisladas de miel de abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*

Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee honey *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity

Fernández-Roblero, S., Grajales-Conesa, J., Rincón-Rabanales, M., Coronel-Niño R., Vázquez-Ovando, A.*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Boulevard Príncipe Akishino sin número Colonia Solidaridad 2000. C.P. 30798. Tapachula, Chiapas, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Fernández-Roblero, S., Grajales-Conesa, J., Rincón-Rabanales, M., Coronel-Niño R., Vázquez-Ovando, A. (2020). Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee honey *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Revista Bio Ciencias* 7, e979. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e979>



ABSTRACT

This study aims to isolate lactic acid bacteria (LAB) from honey produced by the stingless bee *Scaptotrigona mexicana* from southern of Mexico, and to evaluate their probiotic potential. From fresh and fermented honey, 18 strains were isolated. Of these, 10 had presumptive LAB biochemical characteristics. Their ability to grow at different pH values and different temperatures, susceptibility to antibiotics, and ability to inhibit *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* were assessed. All the strains tested were resistant or moderately susceptible to penicillin, dicloxacillin, and ampicillin. The strains that showed tolerance to pH 2.5 were the bacteria labeled FIM1 and FIM2, and only strains OP3 and TUX5 were able to grow at 5 °C.

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: May 03rd 2020.

Accepted/Aceptado: November 20th 2020.

Available on line/Publicado: December 01st 2020.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue aislar bacterias ácido lácticas (LAB) de la miel producida por la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* del sur de México, y evaluar su potencial probiótico. Se aislaron 18 cepas bacterianas de miel fresca y fermentada, diez de estas cepas tenían características bioquímicas presuntamente de LAB. Se evaluó su capacidad para crecer a diferentes valores de pH y diferentes temperaturas, además de la susceptibilidad a antibióticos y la capacidad de inhibir *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Todas las cepas analizadas fueron resistentes o moderadamente susceptibles a la penicilina, dicloxacilina y ampicilina. Las cepas que mostraron tolerancia al pH 2.5 fueron las bacterias codificadas como FIM1 y FIM2, y solo las cepas OP3 y TUX5 pudieron crecer a 5 °C. Aunque ninguno de los sobrenadantes libres de células de las cepas inhibió el desarrollo de bacterias patógenas, se deben realizar otras pruebas para verificar la naturaleza probiótica de las cepas que exhibieron algunas características de interés.

*Corresponding Author:

Alfredo Vázquez-Ovando. Boulevard Príncipe Akishino sin número Colonia Solidaridad 2000. C.P. 30798. Tapachula, Chiapas, Mexico. Phone: +52(962) 6427972. E-mail: jose.vazquez@unach.mx.

Although none of the supernatant growth media of the strains inhibited the development of pathogenic bacteria, other tests should be done to verify the probiotic nature of the strains that exhibited some characteristic of interest.

KEY WORDS

Stingless bees, pH tolerance, pathogen inhibition, antibiotic resistance.

Introduction

Probiotics are defined as living microorganisms that, when supplemented in the diet, are beneficial to the consumer because they improve intestinal microbial balance (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016). The main probiotic microorganisms are lactic acid bacteria (LAB) of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, as well as yeasts of the genus *Saccharomyces* (Ogueke *et al.*, 2010). For a microorganism to be considered probiotic for humans, it must meet such requirements as safety, viability, resistance to acid and bile, ability to produce antimicrobial substances (organic acids, hydrogen peroxide, peptides, and bacteriocins, among others), stimulation of the host's immune response, and effects on metabolic activities, such as vitamin production and cholesterol assimilation (Khusro *et al.*, 2018). All of the above can lead to the reduction of gastrointestinal disorders, improvement of the general state of health, and even decreases in the incidence of colorectal cancer (Arora *et al.*, 2019) and other health disorders.

Due to the beneficial effects of probiotics, there is a constant search for microorganisms with this potential, so they have been isolated from various sources, mainly fermented foods, fruits, or vegetables (Swain *et al.*, 2014). Verón *et al.* (2017) isolated 17 LAB from fermented *Opuntia* juice and reported that the majority of the strains were resistant to pH 3, but only 3 strains (S-22, S-811, and S-TF2) survived at pH 2. Sakandar *et al.* (2019) isolated three strains of LAB from fruits (peach, banana, and kiwi) and five from flowers (sunflower, narcissus, yellow rose, and pink rose). All strains showed survival at the various pH levels tested (2, 2.5, 3, and 7.4), and *L. kunkeei* showed high tolerance to bile salts, *L. plantarum*

PALABRAS CLAVE

Abejas sin aguijón, tolerancia al pH, inhibición de patógenos, resistencia a los antibióticos.

Introducción

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que al ser suplementados en la dieta resultan benéficos para el consumidor, pues mejoran el equilibrio de la microbiota intestinal (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016). Los principales microorganismos probióticos son bacterias ácido lácticas (LAB) de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como levaduras del género *Saccharomyces* (Ogueke *et al.*, 2010). Para que un microorganismo se considere probiótico para humanos, debe cumplir con algunos requerimientos como tener inocuidad, mostrar viabilidad y resistencia al ácido y la bilis, ser capaz de producir sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, péptidos y bacteriocinas, entre otros), estimular la respuesta inmune del hospedador e influir en actividades metabólicas tales como la producción de vitaminas y asimilación de colesterol (Khusro *et al.*, 2018). Todo lo anterior redundo en la reducción de trastornos gastrointestinales, mejorando el estado general de salud e incluso disminuyendo la aparición de tumores de cáncer en colon (Arora *et al.*, 2019) y otros trastornos de la salud.

Por los efectos benéficos de los probióticos, existe una búsqueda constante de microorganismos con este potencial, es por ello, que se han aislado a partir de diversas fuentes, principalmente alimentos fermentados, frutas o vegetales (Swain *et al.*, 2014). Verón *et al.* (2017) aislaron a partir del jugo de nopal fermentado 17 LAB y reportan que la mayoría de las cepas fueron resistentes a pH 3, pero solo 3 cepas (S-22, S-811 y S-TF2) sobrevivieron a pH 2. Del mismo modo, Sakandar *et al.* (2019) aislaron tres cepas de LAB de frutas (melocotón, plátano y kiwi) y cinco de flores (girasol, narciso, rosa amarilla y rosa rosada). Todas las cepas mostraron supervivencia a los diversos niveles de pH probados (2, 2.5, 3 y 7.4), y *L. kunkeei* presentó elevada tolerancia a las sales biliares, *L. plantarum* ATCC 14917 mostró tolerancia media y *F. durionis* y *F. fructosus* tuvieron tolerancia mínima.

Los microorganismos con potencial probiótico también pueden aislarse de muestras poco convencionales.

ATCC 14917 showed medium tolerance, and *F. durionis* and *F. fructosus* had minimal tolerance.

Microorganisms with probiotic potential can also be isolated from unconventional sources. Jampaphaeng *et al.* (2017) isolated five LAB (KJ03, KJ15, KJ17, KJ22, and KJ23) that exhibited antimicrobial activity against pathogens and survived in simulated intestinal conditions from a traditional fermented product of bitter bean (Sataw-Dong). Argyri *et al.* (2013) isolated 71 LAB with probiotic characteristics (17 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Ln. pseudomesenteroides*, 13 *Lactobacillus plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum*, and 2 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) from fermented olives.

Environments associated with western honey bees (*Apis mellifera*) have also been a source of LAB with probiotic potential. Bulgasem *et al.* (2016) isolated 25 LAB from honey samples; four of these strains showed antimicrobial activity against *Candida* spp. and were identified as *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, and *P. pentosaceus*. Two strains of LAB (N4 and N5), which proved to be thermo- and halotolerant, were isolated from bee intestine and honey and showed promising results in tolerance tests to acids, bases, bile salts, and pancreatic enzymes, as well as an antibiotic susceptibility test, a hemolysis test, and an adhesion test (Hamdy *et al.*, 2017).

On the other hand, honey from stingless bees, also called native bees or meliponines, are products with different characteristics from each other (because they come from a great variety of bee genera) and especially from the honey of western honey bees. These honeys have bitter, salty, sweet, and/or astringent flavors, with citrus, floral, fermented aromas, higher viscosity (with respect to honey from western honey bees), and a wide variety of colors (Batista de Sousa *et al.*, 2016; Vit *et al.*, 2017). Compared to honey from western honey bees, meliponine honey has higher water content, free acidity, electrical conductivity, maltose, and nitrogen (Vit *et al.*, 1994; 1998). In addition, honeys from stingless bees contain lactic acid (Gilliam *et al.*, 1990). The high water content (28–37 %) is one of the most important characteristics of honey from meliponines (Ávila *et al.*, 2018). Specifically, in honeys from *Scaptotrigona mexicana* in the Soconusco region, at South of Mexico, values of up to 38 % water have been reported (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). The high moisture content of these honeys promotes spontaneous fermentation (Ramli *et al.*, 2017).

Jampaphaeng *et al.* (2017) aislaron a partir de un producto fermentado tradicional de frijol amargo (Sataw-Dong) cinco LAB (KJ03, KJ15, KJ17, KJ22, KJ23) que exhibieron actividad antimicrobiana contra patógenos y sobrevivencia en condiciones intestinales simuladas. Así mismo, Argyri *et al.* (2013) aislaron 71 LAB con características probióticas (17 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Ln. pseudomesenteroides*, 13 *Lactobacillus plantarum*, 37 *Lb. pentosus*, 1 *Lb. paraplantarum* y 2 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) a partir de aceitunas fermentadas.

Los ambientes relacionados con las abejas melíferas (*Apis mellifera*) también han sido fuente de LAB con potencial probiótico. Bulgasem *et al.* (2016) aislaron 25 LAB de muestras de miel; cuatro de estas cepas mostraron actividad antimicrobiana contra *Candida* spp., las cuales se identificaron como *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*. De manera similar, a partir del intestino de abeja y miel se aislaron dos cepas de LAB (N4 y N5) que demostraron ser termo y halo tolerantes, además que exhibieron resultados prometedores en las pruebas de, tolerancia a condiciones ácidas, alcalinas, sales biliares y pancreáticas, prueba de susceptibilidad a antibióticos, hemólisis y prueba de adhesión (Hamdy *et al.*, 2017).

Por otro lado, las mieles de las abejas sin aguijón también llamadas abejas nativas o meliponinos, son productos con características diferentes entre sí (pues provienen de una gran variedad de géneros de abejas) y sobre todo comparadas con la miel de las abejas melíferas. Se reporta que estas mieles presentan sabores amargos, salados, dulces y/o astringentes, con aromas de cítricos, florales, fermentados, con mayor viscosidad (respecto a la miel de melíferas) y una amplia variedad de colores (Batista de Sousa *et al.*, 2016; Vit *et al.*, 2017). En comparación con la miel de abejas melíferas, las mieles de los meliponinos tienen contenidos altos de agua, acidez libre, conductividad eléctrica, maltosa y nitrógeno (Vit *et al.*, 1994, 1998). Además, se ha reportado que las mieles de las abejas sin aguijón contienen ácido láctico (Gilliam *et al.*, 1990). El mayor contenido de agua (entre 28 y 37 %) es una de las características más importantes de las mieles de meliponinos (Ávila *et al.*, 2018). Específicamente, en las mieles de *Scaptotrigona mexicana* de la región Soconusco, al sur de México, se han reportado valores de hasta 38 % de agua (Espinoza-Toledo *et al.*, 2018). El elevado contenido de humedad de estas mieles promueve la fermentación espontánea (Ramli *et al.*, 2017).

The presence of LAB in the intestinal tract of stingless bees (Morais *et al.*, 2013) suggests their presence in honeys, whether fresh or fermented. Some recent studies have isolated and characterized (Ngalimat *et al.*, 2019) strains of *Bacillus* spp. from *Heterotrigona itama* honey (Zulkhairi-Amin *et al.*, 2020) and other LABs from Meliponine honey (Mohd Hasali *et al.*, 2015) with some probiotic potential. Such bacteria have both technological and physiological functionality, but research that reported on the probiotic potential of LAB isolated from stingless bees or their products remains scarce. Therefore, the objective of the present study was to isolate LAB from honey produced by *Scaptotrigona mexicana* from the Soconusco region in southern Mexico and to characterize its probiotic potential *in vitro*.

Material and Methods

Sampling and isolation of LAB

The sampling sites were meliponicultivist houses in the Soconusco region in the southern state of Chiapas, Mexico, located in Tuxtla Chico (14°55'24.63"N, 92°10'10.41"W), Cacahoatán (14°59'19.16"N, 92°09'54.42"W) and Francisco I. Madero (14°50'54.43"N, 92°22'34.18"W). The hives are intentionally established at the sampling sites and the species-level identification of the bees (*Scaptotrigona mexicana*) was done visually and by hive shape. Samples of honeys were obtained from a stingless bee, *S. mexicana*, both fresh and fermented (fresh in a first sampling and fermented 20 days later, in a second sampling). At each location, three hives (50 mL each) were sampled. The samples were mixed (composite sample), placed in a sterile glass bottle, and transported to the laboratory for further analysis. The procedure above was repeated, and the new composite samples, placed in clear glass containers with plastic lids, were left to ferment for 20 days at the sampling sites at ambient conditions (average temperature of 30 °C and relative humidity of 80 %). The samples were processed to isolate LAB the same day they moved from the sampling site to the laboratory. For the isolation of LAB, dilutions of honey were prepared from the composite sample (10^{-1} , 10^{-2} , and 10^{-3}) with peptone water, and 100 µL of each dilution was dispersed in Petri dishes containing De Man, Rogosa,

La presencia de LAB en el tracto intestinal de las abejas sin aguijón (Morais *et al.*, 2013) sugiere su presencia en las mieles ya sean frescas o fermentadas. En estudios recientes se han aislado y caracterizado (Ngalimat *et al.*, 2019) cepas de *Bacillus* spp. de miel de *Heterotrigona itama* (Zulkhairi-Amin *et al.*, 2020) y otras LABs de miel de meliponinos (Mohd Hasali *et al.*, 2015) con potencial probiótico. Tales bacterias pueden tener funcionalidad tanto tecnológica como fisiológica, pero a la fecha son escasos los estudios que reportan el potencial probiótico de LAB aisladas de abejas sin aguijón o de productos de la misma. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar bacterias ácido lácticas de miel producida por *Scaptotrigona mexicana* de la región Soconusco, en el sureste de México, y caracterizar su potencial probiótico *in vitro*.

Material y Métodos

Muestreo y aislamiento de bacterias ácido lácticas

Los sitios de muestreo fueron casas de meliponicultores en la región Soconusco al sur del estado de Chiapas, México, localizados en Tuxtla Chico (14°55'24.63"N, 92°10'10.41"O), Cacahoatán (14°59'19.16"N, 92°09'54.42"W) y Francisco I. Madero (14°50'54.43"N, 92°22'34.18"O). Las colmenas fueron establecidas intencionalmente en los sitios de muestreo por los meliponicultores y la identificación a nivel de especie de las abejas (*Scaptotrigona mexicana*) se realizó visualmente y por forma de la colmena. Se obtuvieron muestras de mieles de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* tanto fresca como fermentada (frescas en un primer muestreo y fermentadas, 20 días después, en un segundo muestreo). Por cada localidad se muestrearon tres colmenas (50 mL de miel de cada una). Las muestras fueron mezcladas (muestra compuesta), colocada en frasco de vidrio estéril, y transportada al laboratorio para su posterior análisis. Este mismo procedimiento se repitió una vez más, pero esta vez la muestra compuesta, colocada en recipientes de vidrio, se dejó fermentar, por 20 días, en los mismos sitios donde se muestreó a condiciones del ambiente (temperatura media de 30 °C y humedad relativa de 80 %). Las muestras fueron procesadas para aislar las LAB el mismo día que fueron transportadas del sitio de muestreo al laboratorio. Para el aislamiento de las LAB, se prepararon diluciones de la muestra compuesta (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) con agua peptonada, y 100 µL de cada una de las diluciones se dispersaron en placas de Petri conteniendo agar De Man Rogosa y Sharpe (MRS). Posteriormente las placas fueron colocadas en anaerobiosis por 48 h a 30 °C. El procedimiento fue

and Sharpe agar (MRS). Then the plates were placed in anaerobiosis for 48 h at 30 °C. The procedure was performed in triplicate. Upon observing growth, different colonies were selected based on their size, shape, and color. These colonies were reseeded individually onto MRS agar plates until pure cultures were obtained. On each of the strains, biochemical tests of catalase, oxidase, and Gram staining were performed to select the presumed LAB (Barrios-Roblero *et al.*, 2019).

Determination of probiotic potential

The strains that tested negative for oxidase and catalase, stained violet in the Gram stain, and had a bacillary morphology were selected to determine their probiotic potential *in vitro*.

Acidic pH tolerance

From each of the strains isolated, two streaks were taken and inoculated in 5 mL of MRS broth in 16-mL screw-cap test tubes and shaken for 24 h at 30 °C. Each tube was centrifuged (Centrifuge 5403, Eppendorf) at 2380 g for 10 min, the supernatant was removed, and the cell pellet was washed twice with 5 mL phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2). The bacteria were centrifuged at 2380 g for 5 min a last time to obtain the pellet, which was resuspended in 1.5 mL of PBS. From this cell suspension, 50 µL was taken in triplicate to inoculate in 2-mL vials containing 950 µL fresh MRS medium and adjusted to pH 2.5 or pH 6.5 with HCl. The tubes were left shaking for 4 h. Cell growth was measured every 60 minutes (optical density at 560 nm in a Thermo Scientific GENESYS 20 spectrophotometer (Noriega *et al.*, 2004) using fresh MRS broth as blank.

Sensitivity at different temperatures

From each of the strains isolated, two streaks were taken and inoculated in 5 mL of MRS broth in 16-mL screw-cap test tubes and allowed to stir for 24 h at 30 °C. Each tube was centrifuged (Centrifuge 5403, Eppendorf) at 2380 g for 10 min, the supernatant was removed, and the cell pellet was washed twice with 5 mL PBS, pH 7.2. A last centrifugation at 2380 g for 5 min yielded the cell aggregate, which was resuspend in 1.5 mL PBS. From this cell suspension, 50 µL was taken in triplicate to inoculate in 2-mL vials containing 950 µL of fresh MRS broth. The tubes were placed at 5 °C or 37 °C for 48 h. Growth was quantified by optical density at 560 nm in a Thermo Scientific GENESYS 20 spectrophotometer

realizado por triplicado. Al observar crecimiento, se seleccionaron colonias diferentes basadas en su tamaño, forma y color. Estas colonias se sembraron de manera individual en placas con agar MRS hasta lograr cultivos puros. Posteriormente a cada una de las cepas se realizaron las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y tinción de Gram para seleccionar a las presuntas LAB (Barrios-Roblero *et al.*, 2019).

Determinación del potencial probiótico

Las cepas que dieron negativo a las pruebas de oxidasa y catalasa, coloración violeta en la tinción de Gram y morfología bacilar fueron seleccionadas para determinar su potencial probiótico *in vitro*.

Tolerancia a pH ácido

De cada una de las cepas aisladas se tomaron dos asadas y se inocularon en 5 mL de caldo MRS contenido en tubos de ensayo con tapa rosca de 16 mL de capacidad y se pusieron en agitación por 24 h a 30 °C. Posteriormente, cada tubo se centrifugó (Centrífuga 5403, Eppendorf) a 2380 g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el agregado celular se lavó dos veces con 5 mL (cada vez) de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2); centrifugando cada vez a 2380 g durante 5 min para finalmente obtener el sedimento (células) y resuspenderlo en 1.5 mL de PBS. De esta suspensión celular, por triplicado se tomaron 50 µL para inocularlos en viales de 2 mL de capacidad conteniendo 950 µL de caldo MRS fresco y ajustados a pH 2.5 ó 6.5, con HCl. Los tubos se dejaron en agitación por 4 h, determinando cada 60 min el crecimiento celular (densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific GENESYS 20 (Noriega *et al.*, 2004) usando caldo MRS fresco como blanco.

Sensibilidad a diferentes temperaturas

De cada una de las cepas aisladas se tomaron dos asadas y se inocularon en 5 mL de caldo MRS contenido en tubos de ensayo con tapa rosca de 16 mL de capacidad y se pusieron en agitación por 24 h a 30 °C. Posteriormente, cada tubo se centrifugó (Centrífuga 5403, Eppendorf) a 2380 g durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el agregado celular se lavó dos veces con 5 mL (cada vez) de buffer fosfato salino (PBS, pH 7.2); centrifugando cada vez a 2380 g durante 5 min para finalmente obtener el sedimento (células) y resuspenderlo en 1.5 mL de PBS. De esta suspensión celular, por triplicado se tomaron 50 µL para inocularlos en viales de 2 mL de capacidad conteniendo 950 µL de caldo MRS fresco. Los tubos fueron colocados a 5 °C ó 37 °C por 48

(Homayouni *et al.*, 2008) at 0, 18, 24, and 48 h after inoculation using fresh MRS broth as target.

Antibiotic resistance

The agar diffusion test recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (Ross *et al.*, 2014) was used with the strains activated in MRS broth at 37 °C for 24 h and antibiotic combination discs (Bio-Rad) containing amikacin (30 µg), ampicillin (10 µg), cefalotin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), chloramphenicol (30 µg), dicloxacillin (1 µg), enoxacin (10 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), netilmicin (30 µg), penicillin (10 µg), and sulfamethoxazole-trimethoprim (25 µg).

Pathogen inhibition capacity

The inhibition capacity of pathogens of each of the strains was determined by confronting the metabolites produced by each of the strains against the pathogenic bacteria *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. To this end, an inoculum was made in MRS broth from each of the strains and left to stir for 48 h. After this time, each tube was centrifuged, and 30 µL of the supernatant was taken and inoculated into 3-mm wells in nutrient agar from Petri dishes previously inoculated with pathogenic bacteria (Giles-Gómez *et al.*, 2016).

Data analysis

The data are presented as descriptive statistics. OD data for pH conditions were transformed by \ln and plotted against growth time. From the equation of the line, the value of the slope was estimated and it was considered as the growth rates and are expressed as h^{-1} .

Results

Of the six samples of honey (three of fresh honey and three of fermented honey), 18 strains were isolated for macroscopic morphological characterization of LAB (Table 1). Fifty percent of the strains (9) were isolated from samples of fresh honey, and the remaining 50 % came from samples of fermented honey. The most abundant morphology of colonies was small, white, and convex.

Biochemical tests were run on the 18 strains. Only 10 had the typical characteristics of LAB of Gram-positive,

h. Se determinó el crecimiento por densidad óptica a 560 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific GENESYS 20 a las 0, 18, 24 y 48 h (Homayouni *et al.*, 2008) usando caldo MRS fresco como blanco.

Resistencia a antibióticos

Se empleó la prueba de difusión por agar recomendada por la *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (Ross *et al.*, 2014) con las cepas activadas en caldo MRS a 37 °C durante 24 h y multidiscos combinados de antibióticos (BIO-Rad) conteniendo: amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), dicloxacilina (1 µg), enoxacina (10 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), penicilina (10 µg), timetoprim-sulfametoxazol (25 µg).

Capacidad de inhibición a patógenos

La capacidad de inhibición de patógenos de cada una de las cepas fue determinada mediante el enfrentamiento de los metabolitos producidos por cada una de las cepas contra las bacterias patógenas *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Para esto se realizó un inóculo en caldo MRS de cada una de las cepas y se dejó en agitación durante 48 h, pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron y se tomaron 30 µL del sobrenadante para ser inoculados en pocillos de 3 mm de diámetro hechos en agar nutritivo contenido en cajas de Petri previamente inoculadas con las bacterias patógenas (Giles-Gómez *et al.*, 2016).

Análisis de datos

Los datos se presentan con medidas de estadística descriptiva. Los resultados de las densidades ópticas para las condiciones de pH fueron transformados por \ln y graficados contra el tiempo de crecimiento. De la ecuación de la recta, se estimó la pendiente y su valor se consideró como la velocidad de crecimiento expresada en h^{-1} .

Resultados

A partir de las seis muestras de miel (tres de miel fresca y tres de miel fermentada), se aislaron 18 cepas con características morfológicas macroscópicas de LAB (Tabla 1). El 50 % de las cepas (9) fueron aisladas de muestras de miel fresca y el 50 % restante provinieron de muestras de miel fermentada. La morfología más abundante fue de colonias de tamaño pequeño, color blancas y convexas.

A las 18 cepas se les realizaron las pruebas bioquímicas, encontrándose que solamente 10 presentaron las siguientes

Table 1.
Morphology of the colony in MRS agar of each of the strains isolated from honeys of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*.

Tabla 1.
Morfología de la colonia en agar MRS de cada una de las cepas aisladas a partir de mieles de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*.

Strain	Traits
Op1	Pointed form, white color, convex elevation.
Op2*	Circular form, flat elevation, creamy.
Op3	Circular form, white-yellowish color, convex high elevation.
Op4*	Circular form, spreaded elevation, creamy, entire margin.
Op5	Pointed form, white color, convex high elevation.
Op6*	Circular form, flat elevation, entire margin, creamy.
Tux1	Pointed form, creamy, convex elevation.
Tux2*	Circular form, flat elevation, creamy.
Tux3	Pointed form, white color, convex elevation.
Tux4*	Pointed form, creamy, convex elevation.
Tux5	Circular form, white color, convex high elevation.
Tux6*	Circular form, convex high elevation, creamy.
FIM1	Pointed form, creamy, convex elevation.
FIM2	Pointed form, creamy, convex elevation.
FIM3	Pointed form, white color, convex elevation.
FIM4*	Circular form, flat elevation, smooth.
FIM5*	Circular form, flat elevation, creamy.
FIM6*	Circular form, convex high elevation, smooth.

*fermented honey.

*miel fermentada.

catalase-negative, and oxidase-negative (Table 2). The remaining eight lacked at least one of these LAB characteristics. All strains that were not LAB were isolated from fermented honeys (Table 2), which may indicate that these are other genera that developed during fermentation or are contaminants.

Resistance to acidic pH

The 10 evaluated LAB strains were able to tolerate pH 2.5 after 4 h of incubation (Figure 1). Most strains grew normally at pH 6.5, except for TUX 1 and TUX 5, which do not exceed 0.2 absorbance units. The strain that showed the greatest adaptation to the pH of 2.5 was the one encoded as FIM2. FIM3 and FIM1 adapted to a lesser extent or took longer to initiate the increase in OD. This behavior was verified when comparing the growth rates of each of the strains (Table

características para LAB, Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas (Tabla 2). Las ocho restantes no correspondieron con las características de LAB en al menos una prueba. Todas las cepas que resultaron no ser LAB fueron aisladas de mieles fermentadas (Tabla 2), lo cual puede indicar que se trata de otros géneros que se desarrollaron durante la fermentación o que son bacterias contaminantes.

Resistencia a pH ácido

Las 10 cepas de LAB evaluadas fueron capaces de tolerar el pH 2.5 después de 4 h de incubación (Figura 1). La mayoría de las cepas crecieron de manera normal a pH 6.5, a excepción de la cepa TUX 1 y TUX 5, las que no sobrepasan las 0.2 unidades de absorbancia. La cepa que mostró mayor adaptación al pH de 2.5 fue la codificada como FIM2. FIM3 y FIM1 también mostraron aumento en la OD, sin embargo, el tiempo requerido para iniciar el aumento fue

Table 2.
Biochemical tests of strains isolated from honeys of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*.

Tabla 2.
Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas a partir de mieles de la abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*.

Strain	Catalase	Oxidase	Gram staining	
Op1	-	-	+	LAB
Op2*	+	+	-	No LAB
Op3	-	-	+	LAB
Op4*	+	+	-	No LAB
Op5	-	-	+	LAB
Op6*	+	+	+	No LAB
Tux1	-	-	+	LAB
Tux2*	+	+	-	No LAB
Tux3	-	-	+	LAB
Tux4*	-	-	+	LAB
Tux5	-	-	+	LAB
Tux6*	+	+	+	NO BAL
FIM1	-	-	+	LAB
FIM2	-	-	+	LAB
FIM3	-	-	+	LAB
FIM4*	+	+	-	No LAB
FIM5*	+	+	-	No LAB
FIM6*	+	+	-	No LAB

*fermented honey.

*miel fermentada.

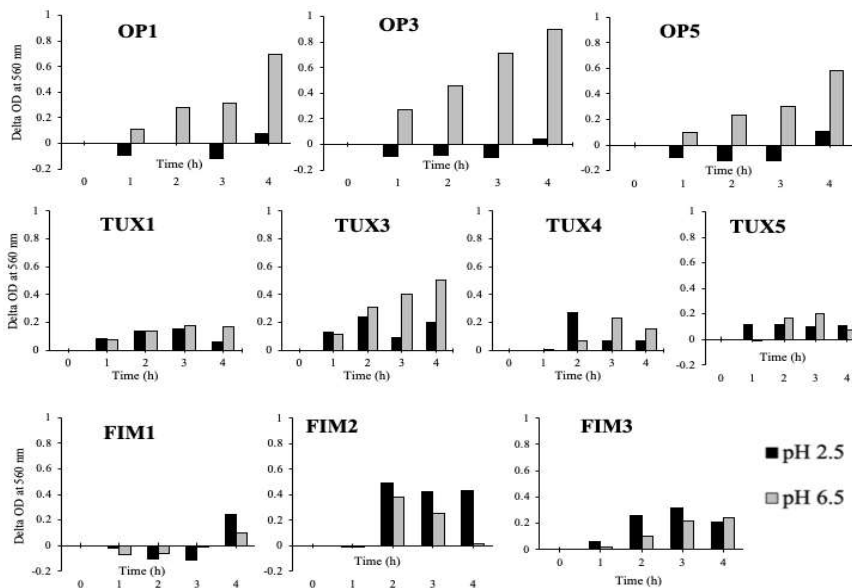


Figure 1. Growth differential ($OD_{560\text{ nm}}$) with respect to time zero at two pH of strains isolated from honey produced by *Scaptotrigona mexicana*.

Figura 1. Delta de crecimiento ($DO_{560\text{ nm}}$) respecto al tiempo inicial a dos pH de las cepas aisladas de la miel producida por *Scaptotrigona mexicana*.

3), as these strains had the highest growth rates, along with the TUX3 strain.

Growth at different temperatures

The 10 strains evaluated showed typical growth at 37 °C (Figure 2). Strains OP1, TUX3, TUX4, FIM1, FIM2, and FIM3 did not show an increase in OD and, on the contrary, showed a decrease in OD at 5 °C, while strains OP5 and TUX1 did not tolerate this temperature. Those that partially tolerated this temperature (there was no visible decrease in OD) were strains OP3, TUX3, and TUX5. Towards the end of the evaluation (48 h), strains TUX5 and OP3 presented OD values practically equal to each other and different from the rest of the strains.

Antibiotic resistance

The results of the antibiotic resistance test are shown in Table 4. All strains were susceptible to enoxacin, ceftriaxone, netilmicin, and amikacin. Resistance to penicillin, dicloxacillin, and ampicillin was found in the majority of strains tested. TUX1 and FIM3 were moderately susceptible to penicillin, dicloxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, and erythromycin. None of the antibiotics used showed

mayor. Este comportamiento, se verificó cuando se comparan las velocidades de crecimiento de cada una de las cepas (Tabla 3), pues estas cepas tuvieron los valores más altos, junto con la cepa TUX3.

Crecimiento a diferentes temperaturas

Las 10 cepas evaluadas mostraron un crecimiento típico a 37 °C (Figura 2). Las cepas OP1, TUX3, TUX4, FIM1, FIM2 y FIM3 no presentaron aumento en la OD y, por el contrario, mostraron disminución de la OD a 5 °C, mientras que las cepas OP5, TUX1 no toleraron esta temperatura. Las que toleraron parcialmente esta temperatura (no hubo descenso significativo en la OD) fueron las cepas OP3, TUX3 y TUX5. Hacia el final de la evaluación (48 h), las cepas TUX5 y OP3 presentaron valores de OD prácticamente iguales entre sí y diferentes del resto de las cepas.

Resistencia a antibióticos

Los resultados obtenidos en la prueba de resistencia a antibióticos se muestran en la Tabla 4. Todas las cepas resultaron susceptibles a enoxacina, ceftriaxona, netilmicina y amikacina. Se encontró resistencia a la penicilina, dicloxacilina y ampicilina en la mayoría de las cepas evaluadas. TUX1 y FIM 3 resultaron tener moderada susceptibilidad a penicilina, dicloxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina, y eritromicina. Para ninguno de los antibióticos empleados

Table 3.
Growth rate (h^{-1}) of each of the LAB strains isolated from *Scaptotrigona mexicana* honeys under two pH conditions.

Tabla 3.
Velocidad de crecimiento (h^{-1}) de cada una de las cepas de BAL aisladas de mieles de *Scaptotrigona mexicana* a dos condiciones de pH.

Strain	pH 2.5	pH 6.5
OP1	0.02	0.16
OP3	0.01	0.22
OP5	0.02	0.14
TUX1	0.01	0.04
TUX3	0.05	0.10
TUX4	0.01	0.03
TUX5	0.02	0.02
FIM1	0.06	0.02
FIM2	0.10	0.19
FIM3	0.05	0.06

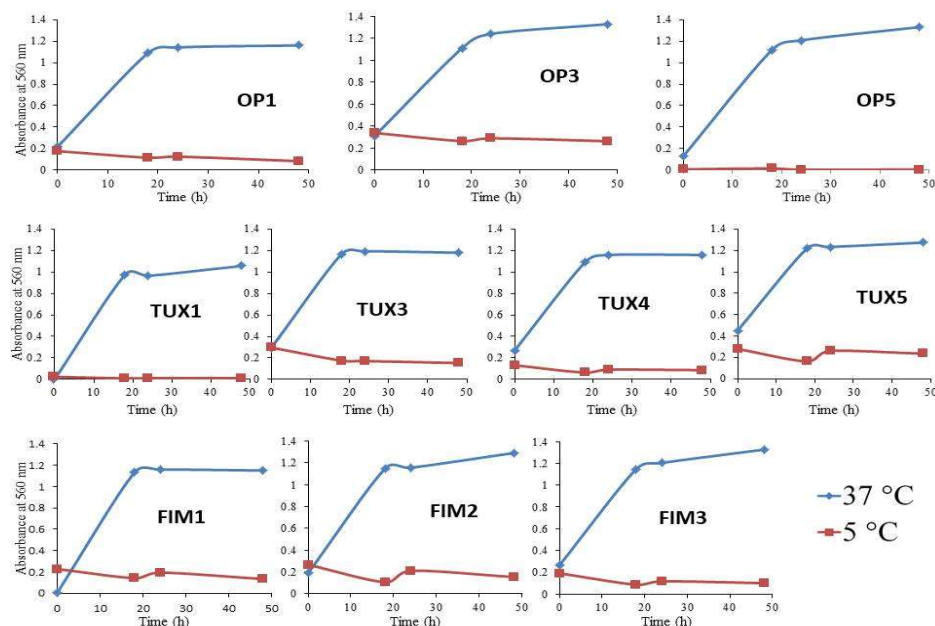


Figure 2. Growth kinetics ($OD_{560\text{ nm}}$) at different temperatures on MRS broth of strains isolated from honey produced by *Scaptotrigona mexicana*.

Figura 2. Cinéticas de crecimiento ($DO_{560\text{ nm}}$) a diferentes temperaturas en caldo MRS de las cepas aisladas de la miel producida por *Scaptotrigona mexicana*.

resistance in all the strains tested; however, for those antibiotics to which a high proportion of strains (> 5) were resistant, the other strains evaluated were moderately resistant (I). Strain TUX4 showed resistance to three of the 12 antibiotics and was the strain with sensitivity to the most antibiotics (Table 4). In contrast, TUX1 showed resistance and moderate susceptibility to 8 of the 12 antibiotics.

Ability to inhibit the growth of pathogenic bacteria

None of the LAB supernatants isolated from honey inhibited the growth of *Salmonella* sp. or *Escherichia coli*.

Discussion

This is the first report of the isolation of LAB from fresh and fermented honeys of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*. The macroscopic

se observó resistencia en el total de las cepas evaluadas, sin embargo, para aquellos antibióticos donde una alta proporción de cepas (>5) fueron resistentes, las otras cepas evaluadas fueron moderadamente resistentes (I). La cepa TUX4 presentó resistencia a tres de los 12 antibióticos y fue la cepa con sensibilidad a más antibióticos (Tabla 4). Por el contrario, la cepa TUX1 presentó resistencia y susceptibilidad moderada a 7 de los 12 antibióticos.

Capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas

Ninguno de los sobrenadantes de las LAB aisladas de miel inhibieron el crecimiento de *Salmonella* sp. o *Escherichia coli*.

Discusión

Los resultados del presente trabajo reportan por primera vez el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de mieles frescas y fermentadas de la abeja sin aguijón

Table 4.
Susceptibility to antibiotics of bacteria isolated from honey produced by *Scaptotrigona mexicana*.

Tabla 4.
Susceptibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas de la miel producida por *Scaptotrigona mexicana*.

Cepa	PE	DC	ENX	NET	GE	CRO	SXT	AK	AM	E	CL	CF
OP1	R	R	S	S	I	S	R	S	R	S	S	I
OP3	R	I	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I
OP5	R	R	S	S	R	S	I	S	R	S	S	I
TUX1	I	I	S	S	R	S	I	S	I	I	I	R
TUX3	R	R	S	S	I	S	I	S	R	S	S	R
TUX5	R	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R
TUX4	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
FIM1	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
FIM2	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
FIM3	I	I	S	S	S	S	I	S	I	I	S	I

S: susceptible; I: intermediate susceptibility; R: resistant.

PE: penicillin (10 µg); DC: dicloxacillin (1 µg); ENX: enoxacin (10 µg); NET: netilmicin (30 µg); EG: gentamicin (10 µg); CRO: ceftriaxone (30 µg); SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg); AK: amikacin (30 µg); AM: ampicillin (10 µg); E: erythromycin (15 µg); Cl: chloramphenicol (30 µg); FC: cephalothin (30 µg).

S: susceptible; I: moderada susceptibilidad; R: resistente.

PE: penicilina (10 µg), DC: dicloxacilina (1 µg), ENX: enoxacina (10 µg), NET: netilmicina (30 µg), GE: gentamicina (10 µg), CRO: ceftriaxona (30 µg), SXT: trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), AK: amikacina (30 µg), AM: ampicilina (10 µg), E: eritromicina (15 µg), Cl: cloranfenicol (30 µg), CF: cefalotina (30 µg).

morphologies of the strains found in this study correspond partially to the biota reported honey from Apis honey bees (Gilliam, 1997), which could come from the nectar collected (Gilliam, 1997) and/or could be of gastrointestinal origin (Elzeini *et al.*, 2020). The presumed strains of LAB and probiotic potentials do not possess the enzymes catalase and oxidase, give violet coloration in the Gram stain, and grow in anaerobiosis (Kandler & Weiss, 1986). We used these criteria to select the 10 LAB. The macroscopic characteristics of the 10 strains chosen, such as white coloration, lack of pigment, some with a shiny surface, others with a matte surface, and all convex, also correspond to the description made by Kandler and Weiss (1986). Yaacob *et al.* (2018) isolated four LAB strains from a stingless bee (*Heterotrigona itama*) and Zulkhairi-Amin *et al.* (2020) isolated two *Bacillus* strains from the honey of the same stingless bee from Malaysia. Gilliam *et al.* (1990) isolated, from the stingless bee *Melipona fasciata*, eight LAB from the honey, 11 LAB from pollen, and 17 from bee-keeping of this bee. The numbers of strains isolated were similar to those reported in the

Scaptotrigona mexicana. Las morfologías macroscópicas de las cepas halladas en este estudio corresponden parcialmente con la biota reportada para miel de abejas melíferas (Gilliam, 1997), las cuales podrían provenir del néctar recolectado (Gilliam, 1997) y/o podrían ser de origen gastrointestinal de las abejas melíferas (Elzeini *et al.*, 2020). Las presuntas cepas de LAB y potenciales probióticos no poseen las enzimas catalasa y oxidasa, dan coloración violeta en la tinción de Gram y crecen en anaerobiosis (Kandler & Weiss, 1986); criterios usados para seleccionar las 10 LAB. Las características macroscópicas de las 10 cepas elegidas, como el color blanco, la carencia de pigmentos, algunas con superficie brillante, otras con superficie mate y todas convexas, corresponden también con la descripción realizada por Kandler y Weiss (1986). Yaacob *et al.* (2018) aislaron cuatro cepas de LAB a partir de miel de la abeja sin aguijón *Heterotrigona itama*, así mismo Zulkhairi-Amin *et al.* (2020) aislaron dos cepas de *Bacillus* de miel de la misma abeja sin aguijón proveniente de Malasia. Gilliam *et al.* (1990) aislaron de la abeja sin aguijón (*Melipona fasciata*) ocho LAB a partir de la miel, 11 de polen y 17 de las crías de esta abeja. Los números de cepas aisladas

present study but show that honeys from other genera of meliponines can be explored to find a greater number of LAB.

The most commonly used criteria to evaluate the probiotic potential of LAB include their ability to tolerate adverse growth conditions, sensitivity to antibiotics, and the production of substances that inhibit the development of other microorganisms (Khusro *et al.*, 2018). Except for strains TUX1 and TUX5, which showed weak growth at physiological pH (6.5), all the other ones evaluated grew in a "normal" way under the physiological conditions evaluated (pH = 6.5 and temperature 37 °C). This demonstrates that the strains can grow within the range of normal body temperature (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016). If the strains are not able to survive in the selected temperature range, then they could not survive in the human intestine, which is an essential feature to show effectiveness as a probiotic. Most strains were unable to multiply when subjected to temperatures of 5 °C, which does not mean that LAB lose their viability but that their metabolism decreases. Strains OP3 and TUX5 were able to multiply at this temperature, considered the storage temperature of many products where they are incorporated (Randazzo *et al.*, 2013). Not all strains tolerated acidic pH conditions (2.5) that simulate the time and conditions that LAB would face during transit through the stomach after possible ingestion (Piątek *et al.*, 2012). Thus, only FIM2 and, to a lesser extent, FIM1 and FIM3 maintained sustained growth during the four hours of evaluation, which is reflected in average values of 0.8 for absorbance and up to 1.2 in some specific cases (Figure 1). This tolerance is encouraging as a proof of the probiotic potential because many probiotic LAB tolerate up to a pH of 3, and below these values, they lose viability (Iyer *et al.*, 2013), so when they are used in food, they have to be coated or encapsulated.

Transmission of antibiotic-resistance genes to pathogenic bacteria in the gut is a major health problem; therefore, it is desirable that probiotics are sensitive to commonly prescribed antibiotics (Lee *et al.*, 2012) or that the resistance they exhibit is inherent to the microorganism; and there is no risk of resistance genes transfer. All strains were susceptible to enoxacin, ceftriaxone, netilmicin, and amikacin. In contrast, resistance to beta-lactam antibiotics (penicillin, dicloxacillin, and ampicillin) was found to different degrees, which may be related to the frequency of use

son similares a los reportados en el presente estudio pero dejan ver que mieles de otros géneros de meliponinos pueden ser exploradas para encontrar un mayor número de LAB.

Los criterios más comúnmente empleados para evaluar el potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas incluyen su capacidad para tolerar condiciones adversas de crecimiento, sensibilidad a antibióticos, y la producción de sustancias que inhiban el desarrollo de otros microorganismos (Khusro *et al.*, 2018). A excepción de las cepas TUX1 y TUX5, las cuales mostraron un débil crecimiento a pH fisiológico (6.5) todas las demás evaluadas crecieron de manera "normal" a las condiciones fisiológicas evaluadas (pH=6.5 y temperatura de 37 °C). Lo anterior demuestra que las cepas pueden crecer dentro del rango de la temperatura corporal normal (Rouxinol-Dias *et al.*, 2016). Si las cepas no son capaces de sobrevivir en el rango de temperatura seleccionado entonces no podrían ser capaces de sobrevivir en el intestino humano, que es una característica esencial para mostrar efectividad como probiótico. La mayoría de las cepas fueron incapaces de multiplicarse cuando se sometieron a temperaturas de 5 °C, esto no significa que las LAB pierden su viabilidad, si no que su metabolismo se disminuye. Las cepas OP3 y TUX5 fueron capaces de multiplicarse a esta temperatura, considerada en muchos productos la temperatura de almacenamiento de los productos donde son incorporados (Randazzo *et al.*, 2013). No todas las cepas toleraron las condiciones de pH ácido (2.5) que simulan el tiempo y las condiciones que enfrentarían las LAB durante su tránsito por el estómago posterior a la posible ingesta (Piątek *et al.*, 2012). Así, solo las bacterias codificadas como FIM2 y en menor medida FIM1 y FIM3 mantuvieron durante las cuatro horas de evaluación un crecimiento sostenido que se refleja en valores promedio de 0.8 para la absorbancia y de hasta 1.2 en algunos casos específicos (Figura 1). Esta tolerancia es alentadora como prueba del potencial probiótico, ya que muchas LAB probióticas toleran hasta pH de 3 y por debajo de esos valores pierden viabilidad (Iyer *et al.*, 2013) por lo que cuando se incorporan en productos alimenticios, tienen que ser recubiertas o encapsuladas.

La transmisión de genes de resistencia a antibióticos hacia bacterias patógenas en el intestino es un problema de salud importante; por lo tanto, es deseable que los probióticos sean sensibles a los antibióticos prescritos comúnmente en baja concentración (Lee *et al.*, 2012) o que la resistencia que exhiban sea inherente al microorganismo y no haya riesgo de transferencia de genes de resistencia. Todas las cepas resultaron susceptibles a enoxacina, ceftriaxona, netilmicina y

of these antibiotics. In other studies, LAB isolated from cheese and pharmaceuticals used as probiotics have been highly susceptible to penicillins has been reported (Gad *et al.*, 2014). TUX1 and FIM3 were moderately susceptible to penicillin, dicloxacillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, and erythromycin, which is in line with other LAB reports (Gad *et al.*, 2014). Abushelaibi *et al.* (2017) also reported that 10 LAB with abated probiotic potential camel milk were moderately susceptible and sensitive to penicillin, ampicillin, clindamycin and erythromycin. However, the isolates were resistant to trimethoprim and vancomycin. For example, vancomycin resistance is very common in *Lactobacillus* species (Federici *et al.*, 2014). Although the mechanism of transfer of genes for antibiotic resistance is vertical, it is suggested that some external genetic elements could favor horizontal transfer, so the WHO suggests that, to the greatest extent possible, strains with antibiotic susceptibility are preferred (Álvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira, 2018). Although almost all LAB used in feeding have different levels of resistance, the strain TUX4 seems to be the most viable candidate of the strains evaluated here. Drago *et al.* (2013) reported genes that confer resistance to gentamicin in 17/26 LAB; most of them belonged to the genus *Lactobacillus*, and more than 25 % of the strains analyzed were resistant to erythromycin (27 %), while resistance to tetracycline was quite infrequent (8 %).

Antimicrobial activity against gastrointestinal pathogenic bacteria is one of the most important and desirable properties of potential probiotic bacteria (Tripathi & Giri, 2014). LAB can exert this antimicrobial activity, producing various fermentative metabolites with bactericidal or bacteriostatic activities, such as lactic acid, acetic acid, fatty acids, hydrogen peroxide or diacetyl peroxide, and antimicrobial proteins such as bacteriocins and peptidoglycan hydrolases (García-Cano *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2014). The metabolites produced by LAB evaluated in the present study did not exert an inhibitory effect on the growth of the pathogenic bacteria used. This same phenomenon has been previously reported, Hasali *et al.* (2015) obtained a total of 5 LAB isolates from Meliponin honey samples; of these five strains, three (LAB001-B, LAB002-C, LAB003-D) showed no inhibition, while LAB004-E and LAB005-F only had an inhibition halo of 5 mm against *E. coli*. The low number of strains analyzed may be the first explanation. A sampling that includes more honeys from

amikacina. Por el contrario, se encontró resistencia en diferente grado a los antibióticos beta lactámicos (penicilina, dicloxacilina y ampicilina) lo cual posiblemente puede estar relacionado con la frecuencia de uso de estos antibióticos. En otros estudios se ha reportado alta susceptibilidad a las penicilinas en LAB aisladas de queso y de productos farmacéuticos usados como probióticos (Gad *et al.*, 2014). TUX1 y FIM 3 resultaron tener moderada susceptibilidad a penicilina, dicloxacilina, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina, eritromicina, lo cual coincide con otros reportes de LAB (Gad *et al.*, 2014). Abushelaibi *et al.* (2017) también reportan que 10 LAB con potencial probiótico aisladas de leche de camello fueron moderadamente susceptibles y sensibles a la penicilina, ampicilina, clindamicina y eritromicina. Sin embargo, las cepas fueron resistentes a trimetoprima y vancomicina. Se sabe por ejemplo que la resistencia a vancomicina es muy frecuente en especies de *Lactobacillus* (Federici *et al.*, 2014). Aunque el mecanismo de transferencia de genes de resistencia a antibióticos es vertical, se sugiere que algunos elementos genéticos externos podrían favorecer la transferencia horizontal, por lo que la OMS sugiere en la medida de lo posible preferir cepas con susceptibilidad a antibióticos (Álvarez-Cisneros & Ponce-Alquicira, 2018). Aunque casi todas las LAB utilizadas en alimentación tienen diferentes niveles de resistencia, la cepa TUX4 parece la candidata más viable de las cepas aquí evaluadas. Drago *et al.* (2013) reportan genes que confieren resistencia a la gentamicina en 17/26 LAB; la mayoría de ellos pertenecían al género *Lactobacillus*, más del 25 % de las cepas analizadas fueron resistentes a la eritromicina (27 %), mientras que la resistencia a la tetraciclina fue poco frecuente (8 %).

La actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas gastrointestinales es una de las propiedades más importantes y deseables en las potenciales bacterias probióticas (Tripathi & Giri, 2014). Las LAB puede ejercer esta actividad antimicrobiana produciendo diversos metabolitos fermentativos con actividades bactericidas o bacteriostáticas tales como ácidos lácticos y acéticos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno o diacetilo y proteínas antimicrobianas tales como bacteriocinas y enzimas peptidoglicanas hidrolasas (García-Cano *et al.*, 2015; Pérez *et al.*, 2014). Los metabolitos producidos por las LAB evaluadas en el presente estudio no ejercieron efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias patógenas empleadas. Este mismo fenómeno, se ha reportado anteriormente, Hasali *et al.* (2015) obtuvieron un total de 5 cepas de LAB de muestras de miel de meliponinos, de éstas, tres cepas (LAB001-B, LAB002-C, LAB003-D) no mostraron inhibición, mientras que las cepas LAB004-E y LAB005-F solo tuvieron un halo de inhibición de 5 mm contra *E. coli*. El bajo número de cepas analizadas en el presente estudio, puede

other species may increase the likelihood of finding LAB with a greater number of probiotic characteristics.

Conclusion

Of a total of 18 strains isolated from the fresh and fermented honey of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana*, 10 exhibited characteristics of LAB. The strains that resisted a pH of 2.5 were FIM2 and FIM1. Only strains OP3 and TUX5 were able to tolerate the temperature of 5 °C. All strains were susceptible to enoxacin, ceftriaxone, netilmicin, and amikacin and were resistant to penicillin, dicloxacillin, and ampicillin. None of the growth supernatants of the strains were shown to inhibit the development of the pathogenic bacteria *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. Because they present some important characteristics, strains TUX3, FIM2, and OP3 could be evaluated more exhaustively and possibly be candidates as probiotics.

References

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P. and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 316-325. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>
- Álvarez-Cisneros, Y. M. and Ponce-Alquicira, E. (2018). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria. In: Antimicrobial Resistance - A Global Threat. Kumar, Y. ed. *IntechOpen*, <https://doi.org/10.5772/intechopen.80624>
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. E., Panagou, E. Z. and Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*, 33(2): 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Arora, M., Ashish, B., Nitesh, K., Saurav, B. and Kamal, J. (2019). Impact of probiotics and prebiotics on colon cancer: Mechanistic insights and features approach. *Current Cancer Therapy Reviews*, 15(1): 27-36. <https://doi.org/10.2174/1573394714666180724122042>
- Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H. and Zambiasi, R. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 81: 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.002>
- Barrios-Roblero, C., Rosas-Quijano, R., Salvador-Figueroa, M., Gálvez-López, D. and Vázquez-Ovando, A. (2019). Antifungal lactic acid bacteria isolated from fermented beverages with activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Bioscience*, 29: 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.008>
- Batista de Sousa, J. M., Leite de Souza, E., Marques, G., Toledo, M., Gullón, B., Pintado, M. and Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT Food Science and Technology*, 65: 645-651. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>
- Bulgasem, Y. B., Lani, M. N., Hassan, Z., Yusoff, W. M. W. and Fnaish, S. G. (2016). Antifungal activity of lactic acid bacteria strains isolated from natural honey against pathogenic *Candida* species. *Mycobiology*, 44(4): 302-309. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.302>
- Drago, L., Mattina, R., De Vecchi, E. and Toscano, M. (2013). Phenotypic and genotypic antibiotic resistance in some probiotics proposed for medical use. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(4): 396-397. <https://doi.org/10.1016/j.ijant.2013.05.011>

- [org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.015](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.015)
- Elzeini, H. M., Ali, A. A., Nasr, N. F., Eleany, Y. E. and Hassan, A. A. M. (2020). Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. *Journal of Apicultural Research*, <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1746019>
- Espinoza-Toledo, C., Vázquez-Ovando, A., Torres-de los Santos, R., López-García, A., Albores-Flores, V. and Grajales-Conesa, J. (2018). Stingless bee honeys from Soconusco, Chiapas: a complementary approach. *Revista de Biología Tropical*, 66(4): 1536-1546. <https://doi.org/10.15517/rbt.v66i4.32181>
- Federici, S., Ciarrocchi, F., Campana, R., Ciandrini, E., Blasi, G. and Baffone, W. (2014). Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. *Meat Science*, 98(4): 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.019>
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M. and Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 25-33. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000100005>
- García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C. E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. and Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology and Biotechnology Applied*, 99(20): 8563-8573. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6593-2>
- Giles-Gómez, M., Sandoval, G. J. G., Matus, V., Campos, Q. I., Bolívar, F. and Escalante, A. (2016). *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from *pulque*, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5: 708. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12678.x>
- Gilliam, M., Roubik, D. W. and Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21(2): 89-97. <https://doi.org/10.1051/apido:19900201>
- Hamdy, A. A., Elattal, N. A., Amin, M. A., Ali, A. E., Mansour, N. M., Awad, G. E. A., Awad, H. M. and Esawy, M. A. (2017). Possible correlation between levansucrase production and probiotic activity of *Bacillus* sp. isolated from honey and honey bee. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 69. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2231-8>
- Hasali, N. H. M., Zamri, A. I., Lani, M. N., Mubarak, A. and Suhaili, Z. (2015). Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *America-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 9(6): 1-6. <http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aejsa/aejsa/2015/Special%20IPN%20Bandung%20Sept/1-6.pdf>
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Razavi, S. H. and Yarmand, M. S. (2008). Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. *Journal of Applied Sciences*, 8(2): 379-382. <https://doi.org/10.3923/jas.2008.379.382>
- Iyer, B. K., Singhal, R. S. and Ananthanarayan, L. (2013). Characterization and *in vitro* probiotic evaluation of lactic acid bacteria isolated from *idli* batter. *Journal of Food Science and Technology*, 50: 1114-1121. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0445-6>
- Jampaphaeng, K., Cocolin, L. and Maneerat, S. (2017). Selection and evaluation of functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional fermented stinky bean (*Sataw-Dong*). *Annals of Microbiology*, 67(1): 25-36. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1233-3>
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Regular, Nonsporulating Gram Positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. eds. 1208-1234. Baltimore. Williams and Williams.
- Khusro, A., Aarti, C., Salem, A. Z. M., Buendía-Rodríguez, G. and Rivas-Cáceres, R. R. (2018). Antagonistic trait of *Staphylococcus succinus* strain AAS2 against uropathogens and assessment of its *in vitro* probiotic characteristics. *Microbial Pathogenesis*, 118: 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.022>
- Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S. and Kim, J. H. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 18(1): 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.015>
- Mohd-Hasali, N. H., Zamri, A. I., Lani, M. N., Mubarak, A. and Suhaili, Z. (2015). Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*,

- 9(6): 1-6. http://www.aensiweb.net/AENSIWEB/aejsa/aejsa_Special%20IPN%20Bandung%20Sept_2015.html
- Morais, P. B., Calaça, P. S. S. T. and Rosa, C. A. (2013). Microorganisms associated with stingless bees. In: Pot-Honey. Vit, P., Pedro, S. and Roubik, D. eds. New York, NY. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_11
- Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z., Yusof, M. T., Syahir, A. and Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigena itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ*, 7: e7478. <https://doi.org/10.7717/peerj.7478>
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A. and de los Reyes-Gavilán, C. G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(1): 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.003>
- Ogueke, C. C., Owuamanam, C. I., Ihediohanma, N. C. and Iwouno, J. O. (2010). Probiotics and prebiotics: Unfolding prospects for better human health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9): 833-843. <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.833.843>
- Pérez, R. H., Zendo, T. and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1): S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Piątek, J., Gibas-Dorna, M., Olejnik, A., Krauss, H., Wierzbicki, K., Żukiewicz-Sobczak, W. and Głowacki, M. (2012). The ability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination *in vitro* study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(1): 99-102. <http://www.aaem.pl/The-viability-and-intestinal-epithelial-cell-adhesion-of-probiotic-strain-combination.71748.0.2.html>
- Ramli, A. S., Basrawi, F., Idris, D. M. N. D., Bin-Yusof, M. H., Ibrahim, T. K., Mustafa, Z. and Sulaiman, S. A. (2017). A new dewatering technique for stingless bees honey. *MATEC Web of Conferences*, 131: 03014. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201713103014>
- Randazzo, C. L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G. and Caggia, C. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Science and Technology*, 33(4): 652-659. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400009>
- Ross, J. E., Scangarella-Oman, N. E., Flamm, R. K., and Jonesa, R. N. 2014. Determination of disk diffusion and MIC quality control guidelines for GSK2140944, a novel bacterial type II topoisomerase inhibitor antimicrobial agent. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7): 2629–2632. <https://doi.org/10.1128/JCM.00656-14>
- Rouxinol-Dias, A. L., Pinto, A. R., Janeiro, C., Rodrigues, D., Moreira, M., Dias, J. and Pereira, P. (2016). Probiotics for the control of obesity - Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal*, 1(1): 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.005>
- Sakandar, H. A., Kubow, S. and Sadiq, F. A. (2019). Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT-Food Science and Technology*, 104: 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038>
- Swain, M. R., Anandharaj, M., Ray, R. C. and Rani, R. P. (2014). Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. *Biotechnology Research International*, 2014: ID250424. <https://doi.org/10.1155/2014/250424>
- Tripathi, M. K. and Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9: 225-241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Verón, H. E., Di-Risio, H. D., Isla, M. I. and Torres, S. (2017). Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT-Food Science and Technology*, 84: 231-240. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.058>
- Vit, P., Bogdanov, S. and Kilchenman, V. (1994). Composition of Venezuelan honeys from stingless bees and *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 25(3): 278-288. <https://doi.org/10.1051/apido:19940302>
- Vit, P., Oddo, L. P., Marano, M. L. and Salas de Mejías, E. (1998). Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. *Apidologie*, 29(5): 377-389. <https://doi.org/10.1051/apido:19980501>
- Vit, P., Pedro, S., Vergara, C. and Deliza, R. (2017). Ecuadorian honey types described by Kichwa community in Rio Chico, Pastaza province Ecuador using free-choice profiling. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(3): 384-387.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.005>

Yaacob, S. N. S., Huyop, F., Ibrahim, R. K. R. and Wahab, R.A. (2018). Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research*, 57(3): 395-405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>

Zulkhairi-Amin, F. A., Sabri, S., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Mohd-Esa, N., Mohd-Lila, M. A. and Zawawi, N. (2020). Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17: 278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010278>