

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS PROVENIENTES DO
TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS SOCIAIS E DOS
PRODUTOS DA COLMEIA**

NAYARA ALVES REIS

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO - 2021

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS PROVENIENTES DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS SOCIAIS E DOS PRODUTOS DA COLMEIA

NAYARA ALVES REIS

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Geni da Silva Sodré

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Coorientador: Dr. Celso Gabriel Vinderola

Coorientadora: Profa. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

AGOSTO - 2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS PROVENIENTES DO
TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS SOCIAIS E DOS
PRODUTOS DA COLMEIA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
NAYARA ALVES REIS**

Realizada em 31 de Agosto de 2021

Profa. Dra. Geni da Silva Sódré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Orientadora)

Prof. Dr. Ferlando Lima Santos
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

Dra. Marly Silveira Santos
Prefeitura Municipal de Cruz das Almas, BA
Examinador Externo

Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

Profa. Dra. Talita Lopes Honorato
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Externo

*Dedico este trabalho a minha mãe e meu pai
(in memoriam) que contribuíram para que eu
chegasse até aqui. Amo vocês eternamente.*

AGRADECIMENTOS

Há oito anos atrás, quando li pela primeira vez sobre Probióticos, me identifiquei de imediato. Achei o máximo como criaturas infinitamente pequenas poderiam mudar o mundo. E de fato mudou o meu, me apaixonei completamente pela pesquisa e por isso me sinto abençoada pela oportunidade em trabalhar com o que amo. Finalmente estou concluindo mais uma etapa de minha vida e o sentimento é de gratidão!

Sou grata a mim mesma, por acreditar e persistir quando era muito mais fácil desistir.

Agradeço ao meu querido Deus por cuidar de mim, me fortalecendo, abençoando e iluminando, sem o qual nada disso seria possível.

Agradeço a toda minha família por ser meu escudo, meu equilíbrio e minha fonte de energia!

Ao meu Pai (*in memoriam*) por sempre valorizar e me apoiar nos estudos. Saudades eternas!!

A minha Mãezinha, que sempre cuidou de mim, a quem devo minha vida! Te amo!!

As minhas irmãs de sangue, alma e coração, por me estimular e vibrar a cada conquista minha!

As minhas sobrinhas, por tornar tudo mais leve e fazer florescer a criança que existe em mim!

Agradeço ao meu baby Claus Burgos, pela companhia no fim desta jornada tornando os dias mais leves. Love you!

A todos os colegas do Grupo INSECTA que direta ou indiretamente me ajudaram em algum momento para o desenvolvimento e finalização da minha pesquisa. Não posso esquecer de Dona Gal, a quem eu tenho grande carinho, sempre me oferecendo seus cafezinhos para começar bem o dia!

Aos meus amigos Beca e Paulitho que moram no meu coração e que sempre estavam disponíveis para solucionar minhas dúvidas de laboratório, me dando força e incentivo.

Agradeço a Dra. Margarete Saraiva por ter me apresentado o mundo das bactérias lácticas e probióticos, pessoa que sempre me inspirou com sua inteligência e humildade.

À minha brilhante amiga Dra. Elizabeth Duarte, a quem carinhosamente chamo de Beth, pelos seus conselhos, e pelas oportunidades para o meu crescimento profissional.

Em especial, agradeço minha orientadora, Prof^a. Dra. Geni da Silva Sodré, exemplo de ser humano a ser seguido no mundo acadêmico, por ser flexível e ter a calma nas horas dos “aperreios”!

Aos meus queridos co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, sem dúvida, levarei todos os conhecimentos transmitidos e não apenas isso, agradeço imensamente pela disponibilidade, mesmo em meio a pandemia, pela atenção ao responder mensagens pelo “zap”, por me dar orientação quando me encontrava perdida nos protocolos dos experimentos. E por tudo mais que nem cabe aqui!!!

Ao Prof. Dr. Celso Gabriel Vinderola que mesmo em Buenos Aires, sempre esteve disponível para me atender prontamente e tirar várias dúvidas.

E por fim, a Prof^a. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto, minha mãe acadêmica, a quem eu admiro, e com quem aprendi tanto sobre microbiologia.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida, sem a qual não seria possível a realização desse trabalho.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por me proporcionar uma experiência única e me acolher como segunda casa nesses 13 anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade em cursar o doutorado.

A banca examinadora pela participação e contribuições valiosas.

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte da minha vida e torcem pelo meu sucesso, minha Gratidão!

Deus abençoe todos vocês!

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

REFERENCIAL TEÓRICO11

ARTIGO 1

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS ASSOCIADAS AS ABELHAS E SEUS PRODUTOS 21

ARTIGO 2

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE *Apis mellifera* E SEUS PRODUTOS 49

ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL, MEL E PÓLEN DE *Melipona scutellaris* L. 69

CONSIDERAÇÕES FINAIS 94

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS PROVENIENTES DO TRATO GASTROINTESTINAL DE ABELHAS SOCIAIS E DOS PRODUTOS DA COLMEIA

Autora: Nayara Alves Reis

Orientadora: Dra. Geni da Silva Sodré

Resumo: Os probióticos são micro-organismos vivos capazes de promover o equilíbrio da microbiota intestinal quando ingeridos em quantidades adequadas. Dentre as diversas fontes onde podem ser isoladas bactérias probióticas, as abelhas e seus produtos têm demonstrado grande potencial devido à presença de bactérias lácticas com capacidade para produzir substâncias antimicrobianas. Assim, esta pesquisa teve como objetivo isolar e identificar bactérias lácticas da microbiota gastrointestinal e dos produtos da colmeia (mel e pólen) das abelhas sociais *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* e avaliar suas propriedades probióticas visando aplicações futuras no desenvolvimento de alimentos funcionais. As amostras foram obtidas no apiário e meliponário localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os isolados foram selecionados primeiramente quanto à coloração de Gram e atividade de catalase. As bactérias lácticas selecionadas foram testadas *in vitro* quanto a atividade antagonista sobre os micro-organismos indicadores *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, suscetibilidade a diferentes antimicrobianos (ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg), tolerância ao pH 2,0; 2,5; 3,0 e a diferentes concentrações de sais biliares (0,05%, 0,1%, 0,5%). Finalmente as bactérias com potencial probiótico foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Para as amostras de *A. mellifera*, 39 bactérias isoladas apresentaram coloração Gram positiva e atividade catalase negativa. Desse total, 69,23% apresentaram inibição sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, 61,53% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 51,28% sobre *Salmonella* Enteritidis, e 53,84% sobre *Listeria monocytogenes* CERELA. A resistência antimicrobiana foi observada para a vancomicina (33%) e gentamicina (30%). Cinco bactérias lácticas apresentaram crescimento em pH 3,0 e quatro em diferentes concentrações de sais biliares (0,05%, 0,1%, 0,5%). Todas as potenciais bactérias lácticas isoladas foram identificadas como *Apilactobacillus kunkei*. Para as amostras de *M.*

scutellaris, 16 micro-organismos apresentaram coloração Gram positiva e atividade de catalase negativa. Quanto a ação antagônica, 56,25% das bactérias lácticas inibiram a presença de *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis, 62,5% *L. monocytogenes* e 75% *S. aureus* e *E. faecalis*. Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina e cloranfenicol, no entanto 58,33% foram resistentes à vancomicina. Três bactérias lácticas apresentaram crescimento em pH 3,0, e também foi observado crescimento nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,5% de sais biliares. As bactérias lácticas com potencial probiótico foram identificadas como *Enterococcus faecium*. O potencial probiótico das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal, mel e pólen de abelhas sociais, demonstra a sua possível aplicação no desenvolvimento de novos produtos funcionais. Além disso, a capacidade dessas bactérias em produzir compostos antimicrobianos possibilita sua futura identificação, sendo uma alternativa no desenvolvimento de fármacos para uso no combate a doenças infecciosas em humanos e animais. Este é o primeiro estudo no Brasil que descreve o isolamento de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes do trato gastrointestinal, mel e pólen de abelhas sociais do Recôncavo baiano.

Palavras-chave: Microbiota gastrointestinal, saúde, probióticos, *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris*.

PROBIOTIC LACTIC BACTERIA FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF SOCIAL BEES AND BEEHIVE PRODUCTS

Author: Nayara Alves Reis

Adviser: Dra. Geni da Silva Sodré

Abstract: Probiotics are live microorganisms capable of promoting the balance of the intestinal microbiota when ingested in adequate amounts. Among the various sources from which probiotic bacteria can be isolated, bees and their products have shown great potential due to the presence of lactic acid bacteria capable of producing antimicrobial substances. Thus, this research aimed to isolate and identify lactic acid bacteria from the gastrointestinal microbiota and from the hive products (honey and pollen) of the social bees *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* and evaluate their probiotic properties for future applications in the development of functional foods. The samples were obtained from the apiary and meliponary located at the Federal University of Recôncavo da Bahia. Isolates were first selected for Gram stain and catalase activity. The selected lactic acid bacteria were tested in vitro for antagonistic activity on the indicator microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptibility to different antimicrobials (ampicillin), amoxicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg), tolerance to pH 2.0; 2.5; 3.0 and to different concentrations of bile salts (0.05%, 0.1%, 0.5%) Finally, bacteria with probiotic potential were identified by sequencing the 16S rRNA gene. For *A. mellifera* samples, 39 isolated bacteria were Gram stained. positive and negative catalase activity. Of this total, 69.23% showed inhibition on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, 61.53% on *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 51.28% on *Salmonella* Enteritidis, and 53.84% on and *Listeria monocytogenes* CERELA. Antimicrobial resistance was observed for vancomycin (33%) and gentamicin (30%). Five lactic acid bacteria grew at pH 3.0 and four at different bile salt concentrations (0.05%, 0.1%, 0.5%). All potential lactic acid bacteria isolated were identified as *Apilactobacillus kunkeei*. For the *M. scutellaris* samples, 16 microorganisms showed Gram positive staining and negative catalase activity. As for the antagonistic action, 56.25% of lactic acid bacteria inhibited the presence of *E. coli* and *Salmonella*

Enteritidis, 62.5% *L. monocytogenes* and 75% *S. aureus* and *E. faecalis*. All isolates were sensitive to antimicrobials: ampicillin, amoxicillin and chloramphenicol, however 58.33% were resistant to vancomycin. Three lactic acid bacteria grew at pH 3.0, and growth was also observed at concentrations of 0.05%, 0.5% and 0.1% of bile salts. Lactic acid bacteria with probiotic potential were identified as *Enterococcus faecium*. The probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract, honey and pollen from social bees demonstrates its possible application in the development of new functional products. In addition, the ability of these bacteria to produce antimicrobial compounds enables their future identification, being an alternative in the development of drugs for use in combating infectious diseases in humans and animals. This is the first study in Brazil that describes the isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from the gastrointestinal tract, honey and pollen of social bees from the Recôncavo Bahia region.

Keywords: Gastrointestinal microbiota, health, probiotics, *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris*.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. O que é probiótico como caracterizar?

Os probióticos são conhecidos como micro-organismos vivos que quando consumidos em determinadas quantidades promovem benefícios à saúde do indivíduo (COSTA et al., 2019). Esses micro-organismos benéficos são capazes de prevenir a disbiose intestinal bem como estimular o sistema imunológico (HMOOD et al., 2019).

Cada cepa probiótica apresenta diferentes funções terapêuticas, assim para uma seleção adequada de um micro-organismo candidato a probiótico deve-se seguir critérios básicos (MISHRA; CHAKRAVARTY; MANDAVGANE, 2021), baseados em três pontos principais: comprovação da identidade do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2021).

Para a comprovação da segurança é necessária a identificação e histórico de uso seguro da cepa, garantido por meio de ensaios *in vitro*, em animais, em humanos e quando disponível vigilância pós-mercado (ANVISA, 2021). A identificação do micro-organismo por meio de técnicas fenotípicas e genéticas, permite o levantamento bibliográfico sendo fundamental no conhecimento de suas propriedades gerais. O perfil de resistência a antimicrobianos de importância clínica, fatores de virulência, como enzimas (hemolisinas), metabólitos tóxicos (aminas biogênicas) ou outras moléculas relacionadas à patogenicidade (invasinas, adesinas, proteínas de superfície), são os principais ensaios *in vitro* que devem ser realizados para comprovar se um micro-organismo é seguro para uso como probiótico (ANVISA, 2021).

A seleção de um probiótico também é determinada pelo seu potencial benéfico no organismo. Os probióticos conferem seus efeitos benéficos à saúde por diferentes mecanismos de ação, como a prevenção da adesão ou colonização de patógenos pela produção de metabólitos com ação antimicrobiana, exclusão competitiva, produção de compostos bioativos com atividade antioxidante, peptídeos, ácidos graxos de cadeia curta, aminoácidos, vitaminas, e a modulação do sistema imunológico pela produção de imunoglobulinas (CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Para que um micro-organismo probiótico exerça seu efeito benéfico é necessário que ele sobreviva às condições adversas do trato gastrointestinal (ácido gástrico, secreção da bile, alterações de pH e enzimas), por isso é necessário a realização de testes *in vitro* que simulem esse ambiente (ANVISA, 2021). A viabilidade do probiótico deve-se manter em torno de 10^6

a 10^7 UFC/mL, algumas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a sobrevivência dos micro-organismos probióticos e incluem o uso de recipientes impermeáveis ao oxigênio, e a microencapsulação (ASPRI; PAPADEMAS; TSALTAS, 2020).

2. Benefícios e mecanismos de ação dos probióticos

Além de melhorar a saúde intestinal, os probióticos podem ser utilizados no tratamento de doenças alérgicas em bebês e crianças (ROOBAB; BATOOL; MANZOOR, 2020) e na prevenção de outras doenças como a incidência de câncer de cólon (HMOOD et al., 2019). No trato gastrointestinal do hospedeiro pode inibir a sobrevivência de bactérias patogênicas mediante exclusão competitiva por nutrientes, espaço e sítios de adesão às células do epitélio intestinal, por inibirem a ação de toxinas e pela produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

Tem sido relatado que o consumo de probióticos melhora a função cerebral, uma vez que, a disbiose intestinal pode resultar no desenvolvimento de doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, distúrbio do espectro do autismo, estresse e depressão (SUGANYA; KOO, 2020). Anatomicamente, o intestino tem uma relação complexa e bidirecional com o Sistema Nervoso Central (SNC), que é denominado como o eixo intestino-cérebro que se cruzam no contexto de saúde e doenças. Essa linha cruzada permite que os sinais viscerais sensoriais do intestino que viajam através do nervo vago influenciem o SNC para regular o reflexo e as mudanças mentais/de humor; por sua vez, o cérebro direciona os sinais para modular a fisiologia intestinal e outras funções. Vários estudos sugerem que a microbiota intestinal influencia o desenvolvimento, funções e distúrbios do SNC e ENS (Sistema Nervoso Entérico) por meio da interação e ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores Toll-like 2 e 4 (TLR2 e TLR4). A disbiose intestinal e a perda associada de integridade da barreira intestinal e permeabilidade intestinal permitem o aumento da translocação dos metabólitos derivados de bactérias intestinais e padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs) em tecidos linfoides mesentéricos, resultando na progressão e desenvolvimento de várias doenças neurológicas (SUGANYA; KOO, 2020).

Ainda são poucas as evidências dos efeitos anti COVID-19 dos probióticos, porém os metabólitos tais como, butirato, desaminotirosina (DAT) e ácidos biliares secundários,

produzidos por eles e transportados através da circulação para os pulmões podem inibir a replicação viral ou melhorar a resposta imune contra o coronavírus (GAUTIER et al., 2021). O butirato aumenta a proliferação dos macrófagos que expressam um nível mais baixo de quimiocina reduzindo o influxo de neutrófilos nos pulmões. Os metabólitos de DAT aumentam a produção de interferons tipo I ao amplificar o receptor do interferon- α/β e o ativador da transcrição 1 além de ativar os linfócitos. Os ácidos biliares secundários afetam diretamente as células T ou diminuem a progênie de vírus (GAUTIER et al., 2021).

3. Bactérias lácticas probióticas

As bactérias do ácido láctico (BAL) são gram-positiva e usam carboidratos como única ou principal fonte de carbono, os gêneros que frequentemente ocorrem na fermentação de alimentos incluem: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* (WANG et al., 2021). Recentemente ocorreu uma fusão entre as famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae* em uma única família *Lactobacillaceae*. Além disso, o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado em 25 gêneros novos (ZHENG et al., 2020).

Dentre os micro-organismos, o gênero *Lactobacillus* é a bactéria láctica mais utilizada na indústria como probiótico. As bactérias lácticas contêm propriedades atrativas para a indústria alimentícia e da saúde, além de serem utilizadas para melhorar o sabor e aroma dos alimentos fermentados, aumentar a nutrição dos alimentos (degradação de polissacarídeos indigestíveis), reduzir substâncias nocivas (degradação de proteínas/eliminando alérgenos proteicos) e aumentar a vida útil (produção de bacteriocinas) dos alimentos, esse grupo de bactérias podem atuar como probióticos promovendo benefícios à saúde (AUDISIO et al., 2017; WANG et al., 2021).

O conhecimento de novas cepas de bactérias lácticas capazes de produzir compostos antimicrobianos ainda não caracterizados, tem grande relevância, pois pode ser uma alternativa contra doenças infecciosas em humanos e animais, uma vez que, o uso de antibióticos tem sido limitado devido à resistência bacteriana (OLOFSSON et al., 2014; ROOBAB et al., 2020).

As bactérias lácticas podem ser encontradas em ambientes ricos em fontes de carbono e proteínas (TEUSINK; MOLENAAR, 2017). Alguns estudos têm mostrado a presença desse grupo de bactérias em abelhas e nos produtos da colmeia (OLOFSSON et al., 2014;

AUDISIO et al., 2015; HMOOD et al., 2019), pois esses ambientes apresentam uma diversidade de micro-organismos que variam de região, floração, fatores ambientais e quantidade de néctar (MA et al., 2020).

Apilactobacillus kunkeei pertence ao grupo das bactérias do ácido láctico frutofílico (FLAB), um subgrupo de bactérias do ácido láctico, descrito recentemente e reconhecido por seu status seguro (VERGALITO et al., 2020). Os FLAB preferem a frutose como substrato de crescimento e habitam apenas nichos ricos em frutose (ENDO et al., 2018). Essa espécie antes nomeada como *Lactobacillus kunkeei* foi reclassificada para destacar a adaptação específica às abelhas (ZHENG et al., 2020). É uma bactéria simbiote com efeitos benéficos documentados na saúde destes insetos, como a capacidade de inibir diferentes patógenos presentes na colmeia (VERGALITO et al., 2020).

Dentre os benefícios que podem ser atribuídos a essa espécie, destacam-se a produção de biofilme contra cepas virulentas de *Pseudomonas aeruginosa* (BERRIOS et al., 2018), produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) com a capacidade para reduzir o colesterol (SAKANDAR; KUBOW; SADIQ et al., 2019; VERGALITO et al., 2020), a habilidade em metabolizar a frutose melhorando a síndrome do intestino irritável mediada pela frutose (SII) (FILANNINO et al., 2019), além de sobreviver em condições estressantes, como nichos ricos em frutose (VERGALITO et al., 2020).

Não há evidências clínicas sobre a patogenicidade do *A. kunkeei*, que tem sido isolada comumente nos produtos da colmeia que historicamente fazem parte da alimentação humana, sugerindo seu possível uso seguro como probiótico humano (VERGALITO et al., 2020). Duas licenças já foram depositadas nos EUA e no Canadá para o uso de *A. kunkeei* em alimentos e produtos parafarmacêuticos (OLOFSSON; VASQUEZ et al., 2008; MATSUURA et al., 2018).

Muitos benefícios têm sido atribuídos ao uso de *Enterococcus* como probiótico, principalmente devido a sua capacidade em produzir substâncias antimicrobianas, como as enterocinas. Essas bacteriocinas tem potencial para aplicação na indústria de alimentos como bio-conservantes naturais contra patógenos de origem alimentar e cepas resistentes a antibióticos (FUGABAN et al., 2021). No entanto, sua utilização como probióticos deve ser cuidadosamente investigada, em virtude de algumas cepas desse gênero serem consideradas patógenos oportunistas (OMER et al., 2021). Sabna et al. (2021) relataram que *E. faecium* BS5 foi um produtor eficiente de ácido gama-aminobutírico (GABA), principal

neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central que pode modular o humor, distúrbios do sono e memória. O GABA, produzidos por algumas bactérias lácticas probióticas desempenha um papel essencial na prevenção de doenças neurais, diabetes tipo 1, câncer, doenças cardiovasculares, doenças imunológicas e asma (DIEZGUTIÉRREZ et al., 2020). Os autores concluíram que essa bactéria láctica é um probiótico promissor e pode ser potencialmente usado para a produção industrial em grande escala na produção de GABA e também para o desenvolvimento de produtos fermentados funcionais (SABNA et al., 2021).

4. Bactérias lácticas probióticas em abelhas sociais

As abelhas melíferas têm grande importância ambiental em virtude do processo de polinização, assim como na economia devido a elaboração de produtos como mel, geleia real, cera e veneno (MARUŠČÁKOVÁ et al., 2020). Apesar disso, tem sido notado o declínio de colônias em todo o mundo, várias são as causas dessas perdas, incluindo patógenos e parasitos (*Paenibacillus larvae*, *Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Nosema* spp., vírus de abelha), pesticidas, água contaminada, uso de antibióticos, má nutrição (MARUŠČÁKOVÁ et al., 2020; PATEL et al., 2020). Esses fatores influenciam diretamente na microbiota intestinal das abelhas que é tão importante para a saúde destes insetos.

Além do seu uso em humanos, as bactérias lácticas probióticas podem ser consumidas por animais com o objetivo de melhorar sua saúde e desempenho na produção. A microbiota intestinal desempenha um papel crucial na manutenção da saúde das abelhas, estimulando o sistema imunológico e inibindo patógenos sendo dessa forma, importante para a prevenção de doenças (MARUŠČÁKOVÁ et al., 2020).

Olofsson e Vasquez (2008) relataram pela primeira vez a presença de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* no estômago de mel e mel de *Apis mellifera*. Hasali et al. (2015) identificaram *Lactobacillus* no mel de abelhas sem ferrão na Malásia. *Lactobacillus kunkeei* foram recentemente identificados no estômago de mel da abelha *A. mellifera* na Turquia (UGRAS, 2017). Pela primeira vez foram isoladas e identificadas bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* no mel armazenado da abelha *A. mellifera* no Irã (FAEHGHEH et al., 2021).

Vergalito et al. (2020) relataram que cepas de *Apilactobacillus kunkeei* isoladas do intestino e pão de abelha apresentaram aspectos relevantes para uso como probiótico. A

presença de enzimas benéficas (β -glucosidase, β -galactosidase e leucina arilamidase), a baixa resistência a antibióticos, a capacidade de inibir *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno oportunista com grande resistência a antibióticos), e a viabilidade na presença de altas concentrações de açúcar foram os resultados observados nesta pesquisa.

Klassen et al. (2021) relataram que o uso do probiótico comercial Protexin® contendo cepas de *Enterococcus faecium*, reduziram significativamente as infecções de colônias de abelhas pelo parasita *Nosema ceranae*, onde observaram um aumento nas populações das abelhas, produção de mel e sobrevivência durante o inverno. Os autores concluíram que a utilização dessa bactéria como probiótico para as abelhas, pode ser uma alternativa eficaz ao uso da fumagilina já que este antibiótico pode causar contaminação nos produtos da colmeia (KLASSEN et al., 2021).

Em um estudo realizado por Audisio et al. (2015), utilizando *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolado do trato intestinal de *Apis mellifera*, na administração em outra colônia da mesma espécie de abelha, observaram que ocorreu um aumento na produção de mel nas colônias tratadas em comparação a amostra controle, além disso houve uma redução de *Nosema* e na incidência de *Varroa* (vetor de patógenos que causa a redução na produção de mel e, até mesmo a morte da colônia). Os autores concluíram que a administração de lactobacilos a cada 15 dias tornava as colônias de abelhas mais fortes e resistentes a doenças (AUDISIO et al, 2015).

Para avaliar o potencial de um probiótico Maruščáková et al. (2020) utilizou uma preparação com *Lactobacillus brevis* B50 Biocenol™ (CCM 8618) isolado do trato digestivo de abelhas saudáveis, e pólen. As abelhas foram alimentadas com a mistura e os resultados mostraram que ocorreu um aumento significativo com relação a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos (abaecin, defensin-1), bem como receptores para reconhecimento de padrão moleculares associados a patógenos (receptor toll-like, proteínas de reconhecimento de peptidoglicano) (MARUŠČÁKOVÁ et al., 2020).

Considerando essa abordagem, fica evidente que a pesquisa científica tem sido cada vez mais incentivada a selecionar novos probióticos de “fontes não convencionais”. O isolamento de novas bactérias lácticas probióticas abre o leque de oportunidades para seu uso no desenvolvimento de novos produtos funcionais, assim como a sua utilização na prevenção de doenças melhorando a qualidade de vida dos indivíduos.

Neste cenário, o atual trabalho teve como principal objetivo isolar, identificar bactérias lácticas da microbiota gastrointestinal e dos produtos da colmeia (mel e pólen) das abelhas sociais *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* e avaliar suas propriedades probióticas visando aplicações futuras no desenvolvimento de alimentos funcionais.

Desta forma, para melhor organização, este manuscrito foi dividido nos seguintes artigos:

Artigo 1: Bactérias lácticas probióticas associadas as abelhas e seus produtos.

Artigo 2: Potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de *Apis mellifera* e seus produtos.

Artigo 3: Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal, mel e pólen de *Melipona scutellaris* L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos**. 2021.

Disponível em:

<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>. Acesso em: 06 abr. 2021.

AUDISIO, M.A. Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the *Apis mellifera* L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, p 22-31, 2017.

ASPRI, M.; PAPADEMAS, P.; TSALTAS, D. Review on non-dairy probiotics and their use in non-dairy based products. **Fermentation**, v. 6, p. 30, 2020.

BERRIOS, P.; FUENTES, J.A.; SALAS, D.; CARRENO, A.; ALDEA, P.; FERNANDEZ, F.; TROMBERT, A.N. Inhibitory effect of biofilm-forming *Lactobacillus kunkeei* strains against virulent *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in honeycomb moth (*Galleria mellonella*) infection model. **Beneficial Microbes**, v. 9, p. 257-268, 2018.

CHUGH, B.; KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 76-82, 2020.

COSTA, G.M.; PAULA, M.M.; BARÃO, C.E.; KLOSOSKI, S.J.; BONAFÉ, E.G.; VISENTAINER, J.V.; CRUZ, A.G.; PIMENTEL, T.C. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 139-148, 2019.

ENDO, A.; MAENO, S.; TANIZAWA, Y.; KNEIFEL, W.; ARITA, M.; DICKS, L.; SALMINEN, S. Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 84, p. 1-14, 2018.

FAEHGHEH, F.; ANOUSHEH, S.; NASER, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored *Apis mellifera* honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, p. 421-426, 2021.

FILANNINO, P.; DI CAGNO, R.; TLAIS, A.Z.A.; CANTATORE, V.; GOBBETTI, M. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. **Critical Reviews Microbiology**, v. 45, p. 65-81, 2019.

FUGABAN, J.; BUCHELI, J.E.V.; HOLZAPFEL, W.H.; TODOROV, S.D. Characterization of partially purified bacteria produced by *Enterococcus faecium* strains isolated from soybean paste active against *Listeria* spp. And vancomycin-resistant Enterococci. **Microorganisms**, v. 9, p. 1085, 2021.

GAUTIER, T.; GALL, S..D.V.; SWEIDAN, A.; TAMANAI-SHACOORI, Z.; JOLIVET-GOUGEON, A.; LORÉAL, O.; BOUSARGHIN, L. Next-Generation Probiotics and Their Metabolites in COVID-19. **Microorganisms**, v. 27, p.1-13, 2021.

HASALI, N.H.M.; ZAMRI, A. I.; LANI, M.N.; MUBARAK, A.; SUHAILI, Z. Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 9, p. 1-7. 2015.

HUGENHOLTZ, P; CHUVOCHINA, M.; OREN, A.; PARKS, D.; ROCHELLE M. SOO, R. Prokaryotic Taxonomy and Nomenclature in the Era of Big Sequence Data. **The ISME Journal**, v. 15, p. 1879-1892, 2021.

HMOOD, K.A.; HABEEB, A.H.; AL-MHNNA, K.I. Antioxidant role of *Lactobacillus* sp isolated from honey bee against histological effects of Ochratoxin *in vivo*. **Journal of Biology**, v. 11, p. 67-80. 2019.

KLASSEN, S.S.; VANBLYDERVEEN, W.; ECCLES, L.; KELLY, P.G.; BORGES, D.; GOODWIN, P.H.; PETUKHOVA, T.; WANG, Q.; GUZMAN-NOVOA, E. *Nosema ceranae* Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*) Treated with Pre/Probiotics and Impacts on Colonies in the Field. **Veterinary Sciences**, v. 8, p. 1-16, 2021.

MA, W.; ZHENG, X.; LI, L.; SHEN, J.; LI, W.; GAO, Y. Changes in the gut microbiota of honey bees associated with jujube flower disease. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 198, p. 1-9, 2020.

MARUŠČÁKOVÁ, I. C.; SCHUSTEROVÁ, P.; BIELIK, B.; TOPORČÁK, J.; BÍLÍKOVÁ, K.; MUDROŇOVÁ, D. Effect of Application of Probiotic Pollen Suspension on Immune Response and Gut Microbiota of Honey Bees (*Apis mellifera*). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 929-936, 2020.

MATSUURA, D.; ASAMA, T.; MOTOKI, H.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K. **Lactic acid bacterium having IgA production promoting activity, and use thereof.** U.S. Patent No. 9,856,451, 2 January 2018.

MISHRA, A.; CHAKRAVARTY, I.; MANDAVGANE, S. Current trends in non-dairy based synbiotics. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, p. 935-952, 2021.

MOUSAVI, M.; HESHMATI, A.; GARMAKHANY, A.D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **Food Science and Technology**, v. 102, p. 80-88, 2019.

OLOFSSON, T.C.; VASQUEZ, A. **Bacteria isolated from fresh honey or the honey producing tract of honey bees.** U.S. Patent No. 9,282,761, 15 March 2016. 2008

OLOFSSON, T.C.; BUTLER, E.; MARKOWICZ, P.; LINDHOLM, C.; LARSSON, L.; VÁSQUEZ, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. **International Wound Journal**, v. 13, p. 668-679, 2014.

OMER, C.; AHMET, H.C.; HAYRETTIN, S.; NEVZAT, Ş.; HASAN, T. Isolation and identification of lactobacilli from traditional yogurts as potential starter cultures. **LWT Food Science and Technology**, v. 148, p. 1-9, 2021.

ROOBAB, U.; BATOOL, Z.; MANZOOR, M.F.; SHABBIR, M.A.; KHAN, M.R.; AADIL, R.M. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion Food Science**, v. 32, p. 17-28, 2020.

PATEL, V.; PAUL, N.; BIGGS, E.; BARBOUR, L.; BORUFF, B. Why bees are critical for achieving sustainable development. **Ambio**, v. 50, p. 49-59, 2021.

SABNA, B.S.; BENCY, T.; RAMASAMY, M.; GAYATHRI, M.; DANIEL, R.F.S.; JAYARAMAN, A. Evaluation of GABA Production and Probiotic Activities of *Enterococcus faecium* BS5. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, p. 993-1004, 2021.

SAKANDAR, H.A.; KUBOW, S.; SADIQ, F.A. Isolation and in-vitro probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. **LWT**, v. 104, p. 70-75, 2019.

SUGANYA, K.; KOO, B. Gut–Brain Axis: Role of Gut Microbiota on Neurological Disorders and How Probiotics/Prebiotics Beneficially Modulate Microbial and Immune Pathways to Improve Brain Functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-29, 2020.

TEUSINK, B.; MOLENAAR, D. Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 7-13, 2017.

- UGRAS, S. Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, v. 41, p. 253-261, 2017.
- VERGALITO, F.; TESTA, B.; COZZOLINO, A.; LETIZIA, F.; SUCCI, M.; S.J.; TREMONTE, P.; PANNELLA, G.; DI MARCO, R.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R.; IORIZZO, M. Potential Application of *Apilactobacillus kunkeei* for Human Use: Evaluation of Probiotic and Functional Properties. **Foods**, v. 9,p. 1-16, 2020.
- WANG, Y.; WU, J.; MENGXIN, L.V.; SHAO, Z.; HUNGWE, M.; WANG, J.; BAI, X.; XIE, J.; WANG, Y.; GENG, W. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers Bioengineering Biotechnology**, v. 9, p. 1-19, 2021.
- ZHENG, J; WITTOUCK, S; SALVETTI, E; CMAP, F.; HMB, H.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P.W; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G.E.; GÄNZLE, M.G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782-2858, 2020.

ARTIGO 1

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS ASSOCIADAS AS ABELHAS E SEUS PRODUTOS

¹Artigo publicado como capítulo de livro pela Editora Científica.

BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS ASSOCIADAS AS ABELHAS E SEUS PRODUTOS

Nayara Alves Reis, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Celso Gabriel Vinderola, Universidad Nacional del Litoral, UNL

Norma Suely Evangelista-Barreto, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Samira Maria Peixoto Cavalcante da Silva, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -
UFRB

Geni da Silva Sodré, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

RESUMO: Os probióticos são micro-organismos vivos capazes de promover o equilíbrio da microbiota intestinal quando ingeridos em quantidades adequadas. Muitas pesquisas têm focado no uso de alimentos probióticos em virtude dos efeitos fisiológicos benéficos a saúde, contribuindo na preven o de doenças. Dentre as diversas fontes com potencial para ser isolado micro-organismos probióticos, encontram-se as abelhas sociais e os seus produtos, devido a presença de bactérias lácticas com capacidade para produzir substâncias antimicrobianas. Dessa forma, esta revisão teve como objetivo compilar informa es bibliográficas acerca de bactérias lácticas probióticas isoladas do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia (mel e pólen) das abelhas sociais. A revisão bibliográfica foi realizada por meio de buscas nas bases de dados: Latin American and Caribbean Health Sciences, PUBMED, Medical Literature Analysis, Science Direct e Google Acadêmico. Os critérios de sele o consideraram os artigos publicados no período entre os anos 1988 a 2021. A filtragem principal dos dados foi obtida por meio do uso das palavras-chave em português e em inglês: “probióticos”, “bactérias lácticas”, “bactérias lácticas em abelhas”, “bactérias lácticas em mel”, “bactérias lácticas em pólen”. As bactérias lácticas presentes nas abelhas têm papel relevante na saúde e sobrevivência desses insetos, realizando importantes fun es na assimila o de nutrientes e no sistema imunológico. Essas bactérias podem ser úteis na aplica o para a apicultura/meliponicultura, produ o de novos alimentos funcionais, assim como na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Microbiota gastrointestinal, biotecnologia apícola, mel, pólen.

PROBIOTIC LACTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH BEES AND THEIR PRODUCTS

ABSTRACT: Probiotics are live microorganisms capable of promoting the balance of the intestinal microbiota when ingested in adequate amounts. Much research has focused on the use of probiotic foods because of their beneficial physiological effects on health, contributing to disease prevention. Among the various sources with potential to be isolated probiotic microorganisms, are social bees and their products, due to the presence of lactic acid bacteria capable of producing antimicrobial substances. Thus, this review aimed to compile bibliographic information about probiotic lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract and from the hive products (honey and pollen) of social bees. The literature review was performed through searches in the databases: Latin American and Caribbean Health Sciences, PUBMED, Medical Literature Analysis, Science Direct and Academic Google. The selection criteria considered the articles published in the period between 1988 and 2021. The main filtering of the data was obtained through the use of keywords in Portuguese and English: “probiotics”, “lactic acid bacteria”, “lactic acid bacteria in bees”, lactic acid bacteria in honey”, lactic acid bacteria in pollen”. The lactic acid bacteria present in bees play an important role in the health and survival of these insects, performing important functions in the assimilation of nutrients and in the immune system. These bacteria can be useful in application for beekeeping/meliponiculture, production of new functional foods, as well as in the pharmaceutical industry.

Keywords: Gastrointestinal microbiota, bee biotechnology, honey, pollen.

1. Introdução

Os probióticos são conhecidos como micro-organismos vivos que quando consumidos em quantidades determinadas promovem benefícios à saúde do indivíduo (COSTA et al., 2019). São capazes de restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal, produzindo metabólitos com ação antimicrobiana e estimulando o sistema imunológico (HMOOD; HABEEB; AL-MHNNA, 2019).

As bactérias lácticas contêm propriedades atrativas para a indústria alimentícia e da saúde, principalmente devido a seu uso na conservação de alimentos e no controle de patógenos em função da produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (AUDISIO et al., 2017). O conhecimento de novas bactérias lácticas, capazes de produzir compostos antimicrobianos ainda não caracterizados, tem grande relevância, pois pode ser uma alternativa contra doenças infecciosas em humanos, uma vez que o uso de antibióticos tem sido limitado devido à resistência bacteriana (OLOFSSON et al., 2014; ROOBAB et al., 2020).

As bactérias lácticas podem ser encontradas em ambientes ricos em fontes de carbono e proteínas (TEUSINK; MOLENAAR, 2017), alguns estudos têm mostrado a presença desse grupo de bactérias em abelhas e nos produtos da colmeia (OLOFSSON et al., 2014; AUDISIO; SABATÉ; BENÍTEZ-AHRENDTS, 2015; HMOOD; HABEEB; AL-MHNNA, 2019), pois esses ambientes apresentam uma grande diversidade de micro-organismos que variam de região, floração, fatores ambientais e quantidade de néctar (MA et al., 2020).

Além do seu uso em humanos, as bactérias lácticas probióticas podem ser consumidas por animais com o objetivo de melhorar sua saúde e desempenho na produção. Neste contexto, o isolamento e identificação de bactérias lácticas com características probióticas deve ser estudado, uma vez que tem potencial para desenvolvimento de produtos funcionais, prevenindo doenças e aumentando a expectativa de vida dos indivíduos. Esta revisão tem o objetivo de compilar informações bibliográficas acerca de bactérias lácticas probióticas que podem ser isoladas do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia (mel e pólen) das abelhas sociais (Apini e Meliponini).

2. Material e métodos

A revisão bibliográfica foi realizada por meio de buscas nas bases de dados: Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS), PUBMED, Medical Literature Analysis (MEDLINE), Science Direct e Google Acadêmico. Os critérios de seleção consideraram os artigos publicados no período entre os anos 1988 a 2021. A filtragem principal dos dados foi obtida por meio do uso das palavras-chave em português e em inglês: “probióticos”, “bactérias lácticas”, “bactérias lácticas em abelhas”, “bactérias lácticas em mel”, “bactérias lácticas em pólen”.

3. Probióticos

Há cerca de 100 anos, o cientista russo e também professor do Instituto Pasteur em Paris, Elie Metchnikoff, observou que o aumento na expectativa de vida dos caucasianos se devia à função benéfica das bactérias lácticas (BAL) presentes nos leites fermentados (HOLZAPFEL; SCHILLINGUER, 2002). Em 1965, Lilly e Stillwell utilizaram pela primeira vez o termo probiótico definindo-o como substância de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros micro-organismos (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2017). Em 1995, Fuller, propôs uma nova definição: "um probiótico é uma preparação composta por micro-organismos vivos ou estimulantes microbianos que afetam a microbiota indígena do animal, planta ou alimento de uma forma benéfica" (MCGUIRE; MCGUIRE, 2015). Atualmente, o conceito de probiótico mais usado é o da Organização Mundial de Saúde de 2001, que define probióticos como micro-organismos capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (GUARNER et al., 2017).

Os probióticos têm sido utilizados principalmente para diminuir a inflamação intestinal restaurando o equilíbrio da microbiota. No trato gastrointestinal do hospedeiro pode inibir a sobrevivência de bactérias patogênicas mediante exclusão competitiva por nutrientes, espaço e sítios de adesão às células do epitélio intestinal, por inibirem a ação de toxinas e pela produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

Algumas bactérias probióticas estão relacionadas com a redução dos níveis de colesterol devido a capacidade dessas bactérias em adsorver essa molécula (RUAS-MADIEDO, 2014),

por meio do aumento da secreção de ácidos biliares e da absorção das fibras dietéticas (KORCZ; KERÉNYI; VARGA, 2018; YILDIZ; KARATAS, 2018). Em um estudo in vivo, a ingestão de bactérias lácticas por camundongos resultou em melhoria do metabolismo lipídico, reduzindo as concentrações séricas de colesterol e triglicérides (TG) (LONDON et al., 2014). Além disto, a presença de bactérias lácticas probióticas podem aumentar a resposta imunológica do hospedeiro em virtude do aumento nos níveis de anticorpos IgA (Imunoglobulina A), citocinas anti-inflamatórias e da atividade dos macrófagos contra patógenos (SAADAT; KHOSROUSHAHIB; GARGARI, 2019; DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

Outro benefício resultante do consumo de probióticos é com relação à degradação da lactose no intestino em função da produção da enzima β -Dgalactosidase. Isto proporciona uma redução no desconforto abdominal associado às diarreias osmóticas, em indivíduos que apresentam intolerância a lactose (SAAD, 2006). Além do que, o consumo de probióticos, como lactobacilos e bifidobactérias, pode estar associado à diminuição do risco de alergia alimentar, por meio da quebra de proteínas com potencial alergênico no trato intestinal (MORAIS; JACOB, 2006).

O consumo de alimentos adicionados de probióticos está associado também à redução de câncer no cólon, em virtude da inibição de bactérias responsáveis por converter substâncias pré-carcinogênicas (como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas) em carcinogênicas, inibição direta na formação de células tumorais pela capacidade de inativação de substâncias carcinogênicas e a estimulação do sistema imunológico do hospedeiro pela produção de linfócitos T, B e macrófagos (ISMAIL; NAMPOOTHIRI, 2013; SABER et al., 2017).

Algumas substâncias produzidas pelas bactérias lácticas como os polissacarídeos extracelulares (EPS) podem ser uma alternativa viável como agente antitumoral (SAADAT; KHOSROUSHAHIB; GARGARI, 2019). Faghfoori et al. (2017) relataram que *Lactobacillus* spp. isolados de produtos lácteos demonstraram efeito anticancerígeno por meio da regulação negativa da expressão dos genes ErbB-2 e ErbB-3 (FAGHFOORI et al., 2017). Em outro estudo, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. acidophilus* apresentaram propriedades contra o crescimento de células do câncer de cólon (DEEPAK et al., 2016).

O uso de substâncias produzidas pelas bactérias lácticas na produção de vacinas tem sido avaliado, especialmente contra patógenos como os vírus (H1N1, hepatite C, AIDS),

parasitas (malária) e micobactérias resistentes (tuberculose) (LI et al., 2014; MOSCOVICI, 2015).

Sabe-se que muitas doenças estão associadas a alterações no eixo intestino-cérebro. Nos últimos anos pesquisadores estão focados no efeito de grupos de moléculas produzidas pelas bactérias lácticas, como resultado do seu metabolismo, que podem ajudar a prevenir e proteger contra diferentes doenças humanas que podem estar associadas à disbiose devido à forte conexão entre o intestino e o cérebro (AGUILAR-TOALA et al., 2018; DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibitório que pode modular o humor, distúrbios do sono e memória. O GABA, produzidos por algumas bactérias lácticas probióticas desempenha um papel essencial na prevenção de doenças neurais, diabetes tipo 1, câncer, doenças cardiovasculares, doenças imunológicas e asma (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020). Atuam principalmente via conexão cérebro-intestino incluindo o trato gastrointestinal, o sistema nervoso central, o sistema nervoso autônomo, o sistema nervoso entérico, o sistema neuroendócrino e o sistema imunológico (KRAIMI et al., 2019). Outros efeitos benéficos dessa substância também foram relatados para diabetes, epilepsia, depressão, ansiedade, esquizofrenia, Alzheimer e Parkinson, portanto, um equilíbrio na quantidade desse neurotransmissor no organismo garante um estado de saúde prevenindo e aliviando sintomas dessas doenças (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

O micro-organismo candidato a probiótico deve apresentar uma série de características, tais como, cepas consideradas seguras (GRAS - “generally recognized as safe”), probabilidade muito baixa de infecção, ou seja, não patogênicas, deve ter atividade antimicrobiana contra patógenos, capacidade de adesão à mucosa do intestino e conseguir sobreviver às condições adversas do estômago, como pH ácido e presença de sais biliares (DE MELO PEREIRA et al., 2018).

Outra característica importante nessa seleção é a resistência aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções humanas, em virtude da possibilidade da transmissão de genes de resistência a micro-organismos patogênicos (DE MELO PEREIRA et al., 2018). Os organismos candidatos a probióticos devem ainda ter a capacidade de inibir micro-organismos patogênicos por meio da produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. O efeito antimicrobiano do ácido

lático está relacionado principalmente com a redução do pH do meio e do pH intracelular do micro-organismo alvo (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

Dentre os antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas, as bacteriocinas, em especial a nisina produzida pelos *Lactococcus lactis*, tem sido muito estudada pela importância nas indústrias de alimentos como bioconservantes, por inibir o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas, como *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, e por não causarem alterações sensoriais nos alimentos (O'CONNOR et al., 2020).

Os probióticos também devem ser capazes de sobreviver às condições tecnológicas, ou seja, devem se manter viáveis e estáveis durante o processamento e estocagem do alimento até o seu consumo. A sobrevivência de bactérias probióticas nos alimentos abaixo da quantidade recomendada pode limitar sua habilidade de exercer os efeitos benéficos na saúde humana (SHAH, 2000; BARBOSA, 2011).

A sobrevivência de bactérias lácticas probióticas ao pH baixo é uma característica importante, pois o ácido do estômago humano que apresenta valores entre pH 0,9 a pH 3,0 na presença de alimentos é uma das barreiras que as bactérias encontram no trato gastrointestinal (ERKKILA; PETAJA, 2000). Assim, um probiótico deve sobreviver pelo menos 90 minutos de exposição em pH 3,0 (BERNARDEAU; VERNOUX; GUEGUEN, 2001).

A presença de sais biliares constitui outra condição adversa para a sobrevivência das bactérias lácticas probióticas. No intestino humano e dos animais a concentração de sais biliares inicia com 2% p/v durante a digestão, reduzindo para 0,3% p/v (GOTCHEVA et al., 2002). Os sais biliares servem como barreira impedindo a aderência de micro-organismos no intestino, por isso as bactérias lácticas probióticas devem resistir as concentrações médias existentes no trato gastrointestinal humano (MAINVILLE; ARCAND; FARNWORTH, 2005; URNAU et al., 2012; MUÑOZ QUEZADA et al., 2013). Embora se tenha conhecimento dos benefícios da ingestão de probióticos, muitos estudos precisam ser realizados para comprovar a eficácia e a segurança de cada cepa, uma vez que os efeitos probióticos tendem a ser específicos da cepa (FONTANA et al., 2013). Para exercer ação benéfica no hospedeiro é necessária a ingestão mínima de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) de células viáveis por dia (ANVISA, 2008).

Os micro-organismos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* (classificado como bactéria láctica) e *Bifidobacterium* são os mais empregados como probióticos na indústria de alimentos (WGO, 2017). Outras bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Leuconostoc e *Streptococcus* também são utilizados como probióticos. Alguns fungos e leveduras do gênero *Aspergillus* e *Saccharomyces* podem ser considerados probióticos (DIEZ-GUTIÉRREZ et al., 2020).

4. Bactérias lácticas (BAL)

As bactérias lácticas pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli e ordem Lactobacillales. As diferentes famílias incluem Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Streptococcaceae. Dentre os principais gêneros do grupo das bactérias lácticas estão *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (BJÖRKROTH; KOORT, 2016; MOZZI, 2016).

O maior grupo de bactérias lácticas pertence ao gênero *Lactobacillus*, que compreende 261 espécies (até março de 2020) (ZHENG et al., 2020). Dentre elas alguns são utilizados como probióticos a exemplo: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e *L. kunkeei* (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2016).

Recentemente Zheng et al. (2020) reclassificaram espécies do gênero *Lactobacillus* com base no sequenciamento completo do genoma, reclassificando-as em 25 gêneros distintos sendo estes: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* e *Lentilactobacillus*. De acordo com os autores esta mudança reflete a posição filogenética dos micro-organismos e agrupa lactobacilos em clados robustos com propriedades ecológicas e metabólicas compartilhadas.

Esse recente estudo taxonômico surgiu da necessidade de um refinamento dentro do gênero *Lactobacillus*, por apresentar micro-organismos que são geneticamente muito distintos com funções metabólica e ecológica muito diversas, mas que estão agrupados dentro do mesmo gênero. A falta de organização taxonômica estimulava a adição de novas espécies

dentro do gênero, impedindo a descrição de propriedades funcionais ou outras comunalidades compartilhadas entre os membros dos subgrupos (ZHENG et al., 2020).

Anteriormente a classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros era baseada em características fenotípicas tradicionais, como a morfologia das colônias, células e características bioquímicas (INÊS et al., 2008). No entanto, a análise da sequência do gene 16S rRNA para classificação e identificação dessas bactérias permitiu não apenas complementar as metodologias clássicas baseadas nas características fenotípicas, mas além disso classificar micro-organismos não cultiváveis (BJÖRKROTH; KOORT, 2016). (HUGENHOLTZ et al., 2021).

As características morfológicas expressam a diversidade desse grupo de bactérias, uma vez que podem apresentar formas de bacilos (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*), de cocos ou coco-bacilos (todos os outros gêneros), exceto o gênero *Weissella* que pode ter a forma de cocos ou bacilos (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; MOZZI, 2016).

De acordo com as características metabólicas, os gêneros podem ser divididos em homofermentativos obrigatórios (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus salivarius*), que são capazes de fermentar hexose pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) quase exclusivamente em ácido láctico. Os heterofermentativos facultativos (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei*) que degradam hexose a ácido láctico pela via EMP e são capazes de degradar pentoses, pois possuem aldolase e fosfoacetolase. E por fim em heterofermentativos obrigatórios (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri*) que degradam hexose pela via das pentoses fosfato produzindo lactato, etanol ou ácido acético e CO₂, além das pentoses que são fermentadas por essa via (FELIS; DELLAGIO, 2005; MOZZI, 2016).

As BAL são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, ácido-tolerantes, desprovida de citocromos, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias facultativas (BJÖRKROTH; KOORT, 2016). Apresentam metabolismo estritamente fermentativo, convertendo açúcar principalmente em ácido láctico (GIRAFFA; CHANISHVILLI; WIDYASTUTI, 2010), são mesófilas, porém possuem a capacidade de crescer em diferentes temperaturas entre 5°C e 45°C. Multiplicam-se em ambientes salinos, mas algumas espécies

são inibidas em concentrações superiores a 6,5% de NaCl (FRANCIOSI et al., 2009; LIMA et al., 2009).

A acidificação do meio e os processos enzimáticos que normalmente acompanham o crescimento dessas bactérias contribuem para as características de aroma, textura e preservação da qualidade microbiológica dos produtos lácteos fermentados (KLAENHAMMER et al., 2005; BJÖRKROTH; KOORT, 2016). As bactérias lácticas podem ser encontradas em vários habitats, como alimentos fermentados, leite, intestino e membranas mucosas de seres humanos e animais, em vegetais, solo e água (BJÖRKROTH; KOORT, 2016; MOZZI, 2016).

A capacidade de adaptação das bactérias lácticas às condições extremas, devido a altas concentrações de ácido láctico produzido, tem favorecido o seu desenvolvimento em diversos ambientes (OLIVEIRA; SILVA, 2011). No entanto, por serem fastidiosas, se multiplicam, principalmente, em ambientes ricos em fontes de carbono e proteínas (TEUSINK; MOLENAAR, 2017).

Recentemente, um subgrupo das bactérias lácticas foi descrito, conhecidas como bactérias lácticas frutofílicas (FLAB), um grupo especial de bactérias lácticas. São microorganismos geralmente encontrados em ambientes ricos em frutose, como flores, frutas e intestino de insetos (MAENO et al., 2016).

Apilactobacillus kunkeei é classificada como a única bactéria obrigatória do ácido láctico frutofílico. Essa espécie é diferenciada de outros lactobacilos devido ao melhor crescimento na presença de oxigênio, fraco crescimento em glicose, e produção de altas concentrações de acetato a partir do metabolismo da glicose (MAENO et al., 2016). A *kunkeei* é considerada a espécie típica do gênero e foi referida anteriormente como *Lactobacillus kunkeei*. Uma bactéria anaeróbia facultativa que foi originalmente isolada do vinho, no entanto, é tipicamente associada às abelhas melíferas e flores (ZHENG et al., 2020).

Atualmente o gênero ao qual essa bactéria pertence apresenta sete espécies: *Apilactobacillus kunkeei*, *Apilactobacillus apinorum*, *Apilactobacillus kosoi*, *Apilactobacillus micheneri*, *Apilactobacillus ozensis*, *Apilactobacillus quenuiae* e *Apilactobacillus timberlakei*. Todas as espécies são heterofermentativas com crescimento na faixa de 15-37 °C, apresentam forma de bastonete, e crescem em condições ácidas abaixo de pH 3,0 convertendo frutose em manitol. O que diferencia as espécies dentro do gênero são as propriedades fisiológicas

relacionadas principalmente às condições de crescimento como a presença de oxigênio, faixa de temperatura, pH, além da matéria prima na qual foi encontrada (ZHENG et al., 2020).

As bactérias lácticas contêm propriedades atrativas para a indústria alimentícia e da saúde, tem sido utilizada principalmente na conservação de alimentos e no controle de patógenos devido a produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (SAADATA; KHOSROUSHAHIB; GARGARI, 2019). Levando em consideração o contexto atual sobre alimentação saudável e natural, a biopreservação utilizando bactérias lácticas representa alternativa potencial para substituir ou reduzir o uso dos conservantes químicos (LEYVA-SALAS et al., 2017).

Os principais gêneros considerados seguros e utilizados na indústria de alimentos incluem *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carne) e as espécies *Oenococcus oeni* (vinho) e *Streptococcus thermophilus* (leite). Além de desempenhar papel na biopreservação dos alimentos fermentados, esses micro-organismos melhoram as características físico-químicas e sensoriais dos alimentos (INÊS et al., 2008; MOZZI, 2016).

Ouiddir et al. (2019) observaram que *Lactobacillus plantarum* CH1 se mostrou a cepa mais antifúngica dentre as cepas testadas em produtos de panificação e laticínios. Além disso, os autores relataram que *L. plantarum* CH1 não alterou as propriedades sensoriais dos produtos finais. Em outro estudo, Leyva-Salas et al. (2018) observaram que a combinação de *L. plantarum* L244 com *L. harbinensis* L172 (A1) poderia retardar o crescimento de *Penicillium commune*, *Mucor racemosus* e *Rhodotorula mucilaginosa* em iogurte por 2 a 24 dias, sem afetar as características sensoriais. *Lactobacillus helveticus* apresentou um potencial efeito antagonista contra os micro-organismos patogênicos e deterioradores de alimentos, como *Bacillus cereus*, *Candida parapsilosis*, *Escherichia coli*, *Penicillium chrysogenum*, *Salmonella* entérica e *Staphylococcus sciuri* (AL-GAMAL et al., 2019).

As bactérias lácticas também podem ser utilizadas na indústria de alimentos como cultura *starter*, promovendo transformações na matéria-prima mediante processo fermentativo, contribuindo de forma positiva para o aroma e sabor dos alimentos. As bactérias utilizadas como cultura *starter*, podem ou não ter características probióticas. Quando, além de colaborar com o perfil sensorial do produto final aumentando o valor nutritivo por meio da síntese de vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas, podem contribuir na segurança

microbiológica devido a produção de compostos antimicrobianos (MOZZI, 2016; CORTÉS-RODRÍGUEZ et al., 2018).

O desenvolvimento de estudos visando à produção de alimentos probióticos tem sido cada vez maior, devido a conscientização dos consumidores por um estilo de vida mais saudável. Na indústria de alimentos, as bactérias lácticas são aplicadas na produção de leites fermentados, iogurtes, queijo e também no processamento de carnes, bebidas alcoólicas e vegetais (BRUNO, 2011).

Os produtos lácteos detêm a maior parte do mercado funcional de alimentos devido a possibilidade de adição de bactérias lácticas com potencial probiótico, entre os quais o iogurte tem sido muito popular e consumido no mundo (ABDEL-HAMID et al., 2020; KENNAS et al., 2020). As bactérias do gênero *Lactobacillus* são comumente utilizadas como probióticos em iogurtes, principalmente devido a sua capacidade de crescer no leite, ser considerada segura e ter efeitos potenciais à saúde do consumidor (MOINEAU-JEAN et al., 2019).

Estratégias para manter a viabilidade das bactérias probióticas no iogurte é um importante ponto a ser abordado (MOUSAVI et al., 2019). A adição de diferentes produtos, incluindo fibra de frutas, casca de maracujá em pó, preparações de frutas, farelo de arroz e linhaça no iogurte podem influenciar a viabilidade dos probióticos e as propriedades físico-químicas, texturais e sensoriais do iogurte (DEMIRCI et al., 2017; ZHANG et al., 2018; MOUSAVI et al., 2019) e também aumentar as atividades biológicas desse alimento (COSTA et al., 2019; ABDEL-HAMID et al., 2020; KENNAS et al., 2020).

5. Bactérias lácticas relacionadas as abelhas e seus produtos (mel e pólen)

As abelhas são animais importantes na manutenção da biodiversidade por meio da polinização das plantas (EIMANIFAR et al., 2018). Estes insetos dependem de pólen e néctar como recurso para a sua alimentação (RUEDENAUER et al., 2020). São os principais agentes polinizadores, apresentando uma relação de dependência recíproca, ou seja, a abelha encontra nas flores o néctar e o pólen necessários à sua sobrevivência, enquanto que uma parte do pólen aderido ao seu corpo é transportada e, em contato com outra flor, promove a fecundação (FATTORINI; GLOVER, 2020). Essa relação tem garantido aos vegetais o sucesso na

polinização cruzada, viabilizando sua variabilidade genética e a produção de bons frutos (KUMAR; SINGH; SINGH, 2020).

Dentre as abelhas, as espécies sociais são bem conhecidas devido a exploração para obtenção de seus produtos e como principal agente polinizador (SILVA; PAZ, 2012). As abelhas produzem mel, pólen, geléia real, própolis, entre outros. No entanto, os valores resultantes do processo de polinização, em virtude do aumento da produtividade das culturas agrícolas contribuem monetariamente com bilhões de renminbi por ano (DONG et al., 2020; KHAN et al., 2020). Apesar disso, a sobrevivência das abelhas tem sido ameaçada, devido às mudanças climáticas, uso de pesticidas, antibióticos e infecção por patógenos e parasitos, entre eles *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis*, *Nosema apis* e *Varroa destructor* (DAISLEY et al., 2020; KHAN et al., 2020).

Dentre os produtos das abelhas sociais, o mel tem sido o de maior interesse comercial (GOIS et al., 2013). É conhecido mundialmente devido seu sabor, aroma, qualidade nutricional (FERREIRA et al., 2009) e por ser considerado um produto terapêutico e benéfico à saúde (NEVES et al., 2015), com ações terapêuticas como propriedades antimicrobiana, antioxidante, calmante, regenerativa de tecidos, prebióticas e protetor de doenças gastrointestinais (SILVA et al., 2006).

O mel é um alimento complexo natural constituído principalmente por frutose 38%, glicose 31% e água 20%. Apresenta vários compostos em menores quantidades, como polissacarídeos, ácidos orgânicos, lipídios, vitaminas, minerais, aminoácidos, proteínas, enzimas e compostos fenólicos (NUTTER et al., 2016; HE et al., 2020). A composição e as propriedades do mel variam principalmente de acordo com a fonte floral, além de fatores como: condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento. A microbiota do mel também pode variar e pode ser introduzida pelas próprias abelhas ou de forma indesejada por falta de higiene durante a manipulação, extração e beneficiamento do produto (NEVES et al., 2015).

A composição do açúcar e as porcentagens de umidade são consideradas parâmetros de amadurecimento do mel. Em virtude da baixa atividade de água, baixo pH e presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o mel “maduro” (mel operculado) não oferece condições favoráveis para o crescimento de micro-organismos (NUTTER et al., 2016; PASCUAL-MATÉ et al., 2018). No entanto, bactérias lácticas foram isoladas em grande quantidade no mel “verde” (mel desoperculado) de abelhas melíferas (Apini), mel que normalmente

apresenta um alto teor de água (OLOFSSON et al., 2011; VÁSQUEZ et al., 2012; OLOFSSON et al., 2014).

Em outra pesquisa foi descoberta uma microbiota bacteriana na vesícula melífera das abelhas (OLOFSSON; VÁSQUEZ, 2008), composta por 40 espécies de bactérias lácticas (OLOFSSON et al., 2014). As bactérias lácticas estiveram presentes e ativas no mel “verde” de *Apis mellifera* e também no mel de algumas espécies de abelhas sociais sem ferrão (Meliponini) (OLOFSSON et al., 2011; VÁSQUEZ et al., 2012).

O mel exibe efeito prebiótico em virtude da presença de fruto-oligossacarídeo (FOS) (MOHANTY et al., 2018; DE MELO et al., 2020), que promove o crescimento seletivo de bactérias benéficas no cólon, incluindo as culturas probióticas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GIBSON et al., 2017; IRAPORDA et al., 2019).

O efeito prebiótico in vitro também foi constatado em méis de abelhas sociais sem ferrão. Diferentes tipos de méis produzidos por diversas espécies do gênero *Melipona*, apresentaram potencial prebiótica sobre as culturas probióticas *L. acidophilus* LA-05 e *Bifidobacterium lactis* BB-12 (DE MELO et al., 2020).

O mel pode melhorar as características nutricionais, físico-químicas e sensoriais dos alimentos (FARIAS et al., 2019). A preferência dos consumidores por alimentos mais saudáveis tem levado a indústria a buscar opções mais naturais (COSTA et al., 2019). Nesse sentido, o mel, é considerado um adoçante adequado para a fabricação de produtos lácteos fermentados, como o iogurte, uma vez que, pode mascarar seu sabor ácido, além de não ter ação sobre as bactérias iniciantes (KENNAS et al., 2020).

O uso do mel na fabricação de produtos lácteos pode aumentar a atividade e viabilidade de muitas cepas de bactérias lácticas probióticas. No geral, a suplementação com mel oferece uma opção promissora para desenvolver novos produtos funcionais, ricos em compostos promotores de saúde e, portanto, preferidos pelos consumidores. Além disso, quando utilizados em conjunto probióticos e prebióticos têm uma eficácia maior no trato gastrointestinal do que quando utilizado isoladamente (MOHANTY et al., 2018).

Diferente dos probióticos, os prebióticos são carboidratos não digeríveis que podem ser usados como fonte principal de energia pela microbiota intestinal, responsável por manter a boa saúde no organismo. Os prebióticos desempenham um papel imprescindível na modulação da expressão de genes e têm um alto impacto no metabolismo humano (KHANGWAL; PRATYOOSH, 2019).

Outro produto da colmeia importante é o pólen, coletado pelas abelhas que tem grande relevância, pois as abelhas dependem dele para o suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos utilizados na sua alimentação (MARCHINI; REIS; MORETI, 2006). Além do mais, o pólen tem sido utilizado como suplemento na dieta humana por ser nutritivo e pelo benefício atribuído ao seu consumo como estimulante e gerador de bem-estar e vigor físico, atividade antibacteriana, imunomodulatória, anticariogênica e antioxidante (MODRO et al., 2007; MENEZES et al., 2010). A composição do pólen varia com a espécie vegetal, idade da planta, condição nutricional da planta e condições ambientais durante o seu desenvolvimento (MELO et al., 2009).

Os micro-organismos presentes no pólen colonizam o intestino das abelhas e criam uma microbiota permanente em seu trato intestinal (GLINSKI; JAROSZ, 1988). Além disso, a interação entre as abelhas campeiras e as recém-emergidas influencia na formação da microbiota intestinal desses insetos (MARTINSON; MOY; MORAN, 2012). Dentre os micro-organismos presentes no trato gastrointestinal das abelhas, a bactéria láctica do gênero *Lactobacillus* tem sido comumente isolada (OLOFSSON; VÁSQUEZ, 2008; TAJABADI et al, 2011).

O trato gastrointestinal da abelha é um tubo contínuo que se inicia na boca e termina no ânus. O intestino anterior (estomodeu) e o posterior (proctodeu) são de natureza ectodérmica e suas células liberam cutícula, enquanto as células do intestino médio (mesêntero) secretam uma fina membrana peritrófica. Na abelha adulta a membrana peritrófica realiza atividades enzimáticas, e também está envolvida na defesa contra substâncias químicas prejudiciais encontradas nos alimentos e na proteção contra patógenos. Nas larvas das abelhas, essa membrana ainda não está totalmente formada, o que facilita a entrada de patógenos como *P. larvae* (KHAN et al., 2020).

O intestino das abelhas contém uma diversidade de espécies de micro-organismos, mas que dependem significativamente dos diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas, localização no intestino, espécie da abelha, clima e localização geográfica. (DONG et al., 2020). Em seu trabalho de revisão, Khan et al. (2020) mostraram resumidamente as comunidades microbianas que estão associadas ao intestino de larvas e/ou abelhas adultas. As bactérias lácticas encontradas nas abelhas, produzem proteínas extracelulares (enzimas, bacteriocinas, lisozimas) implicadas em atividade antimicrobiana, na interação do hospedeiro ou na formação de biofilme. Ainda segundo os autores, *A. kunkeei* é a bactéria láctica

dominante entre todas as outras microbiotas associadas às abelhas (KHAN et al., 2020). Além disso, *A. kunkeei*, também pode ser encontrada no “pão” da abelha, ou seja, no pólen armazenado no interior da colmeia (ANDERSON et al., 2014).

Segundo Sakandar et al. (2019), *A. kunkeei* apresentou potencial probiótico significativo em termos de atividade antipatogênica e tendência a sobreviver em condições intestinais simuladas, além do mais, pode ser utilizado na fermentação de cereais e consumidos por humanos com o objetivo de prevenir o risco de síndrome do intestino irritável.

As medidas para controlar as doenças nos apiários incluem tratamento com antibióticos, melhoramento seletivo para comportamento higiênico, aplicação de óleos essenciais bioativos, terapia com bacteriófagos e administração de indóis sintéticos para inibir a germinação de *P. larvae* (DAISLEY et al., 2020).

A bactéria *A. kunkeei* foi considerada um probiótico promissor para as abelhas por ser capaz de inibir *Melissococcus plutonius*, um importante patógeno para as abelhas (ENDO et al., 2014). Estudos indicam que a bactéria láctica *A. kunkeei* isoladas do intestino de *A. mellifera jemenitica* da Arábia Saudita foi capaz de diminuir a mortalidade de larvas (estágio em que o organismo é vulnerável) de abelhas infectadas com o patógeno *P. larvae*. Ainda segundo os autores, a capacidade em inibir *P. larvae*, se deve ao fato de que *A. kunkeei* produz substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, benzoato e proteínas com funções antimicrobianas (bacteriocinas), que protegem o hospedeiro de patógenos invasores (AL-GHAMDI et al., 2018).

Em outra pesquisa *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isolados do intestino de abelha foram pulverizados na colmeia, na população de cria e no pólen, induzindo uma promoção significativa no mel colhido (ALBERONI et al., 2018).

O uso de *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolado do trato intestinal de *A. mellifera*, na administração em outras colônias da mesma espécie de abelha, promoveu o aumento na produção de mel nas colônias tratadas em comparação ao controle, ocorrendo uma redução de *Nosema* e na incidência de *Varroa* (vetor de patógenos que causa a redução na produção de mel e, até mesmo a morte da colônia) (AUDISIO; SABATÉ; BENÍTEZ-AHRENDTS, 2015). Os autores concluíram que a administração de lactobacilos a cada 15 dias tornava as colônias de abelhas mais fortes e resistentes a doenças.

Bactérias lácticas isoladas do intestino de abelhas foram testadas quanto a capacidade em inibir uma doença causada pelo micro-organismo *P. larvae*. Os autores observaram que a

suplementação das colônias contendo cinco culturas de bactérias lácticas, duas pertencentes a *L. plantarum*, duas culturas diferentes de *A. kunkeei*, uma cultura de *Lactobacillus* sp., inibiram o patógeno reduzindo significativamente o número de larvas infectadas (MAHMOUD et al., 2019). Com esses resultados surgem alternativas futuras para o tratamento de infecções nas abelhas utilizando bactérias lácticas.

O desenvolvimento econômico no setor apícola/meliponícola depende em grande parte do estado de saúde das colônias de abelhas. Dessa forma, alteração na microbiota intestinal desse organismo influencia o seu metabolismo, ficando suscetível a patógenos oportunistas, reduzindo seu condicionamento físico e a taxa de sobrevivência das abelhas (KHAN et al., 2020).

Nesse sentido, a microbiota intestinal das abelhas apresenta um importante papel na assimilação de nutrientes e no seu sistema imunológico (PATTABHIRAMAIAH; REDDY; BRUECKNER, 2012). As bactérias lácticas realizam importantes funções metabólicas e protetoras no trato gastrointestinal das abelhas, sendo essencial na saúde e sobrevivência destes insetos (PATTABHIRAMAIAH; REDDY; BRUECKNER, 2012). Além disso, a alimentação artificial suplementada com bactérias lácticas probióticas pode melhorar notavelmente a resistência à doença aumentando a imunidade do hospedeiro e regulando a microbiota intestinal (KHAN et al., 2020).

6. Conclusões

As bactérias lácticas apresentam papel crucial e significativo na vida das abelhas, com vasto campo para a pesquisa em função da diversidade de espécies de abelhas, particularmente àquelas sociais. Além de presentes no sistema gastrointestinal, essas bactérias também são encontradas nos principais produtos das colmeias, o mel e o pólen. Extremamente valiosas para as abelhas, essas bactérias também têm potencial para uso como probióticos nas indústrias de alimentos, farmacêutica e no agronegócio apícola, o que torna essa temática atual, de interesse econômico e de relevância para a pesquisa técnico-científica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) código financeiro 001 e pela bolsa de doutorado concedida (número do processo 88882.424451/2019-01).

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, M.; ROMEIH, E.; HUANG, Z.; ENOMOTO, T.; HUANG, L.; LI, L.; Bioactive properties of probiotic set-yogurt supplemented with *Siraitia grosvenorii* fruit extract. **Food Chemistry**, v. 303, p. 125-400, 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2008. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.html. Acesso em: 25 mar. 2018.

AGUILAR-TOALA, J.E.; GARCIA-VARELA, R.; GARCIA, H.S.; MATA-HARO, V.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends Food Science and Technology**, v. 75, p. 105-114, 2018.

ALBERONI, D.; ALBERONI, D.; BAFFONI, L.; GAGGIÀ, F.; RYAN, P.M.; MURPHY, K.; ROSS, P.R.; STANTON, C.; DI GIOIA, D. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. **Benef. Microbes**, v. 9, p. 269-278, 2018.

AL-GAMAL, M.S.; IBRAHIM, G.A.; SHARAF, O.M.; RADWAN, A.A.; DABIZA, N.M.; YOUSSEF, A.M.; EL-SSAYAD, M.F. The protective potential of selected lactic acid bacteria against the most common contaminants in various types of cheese in Egypt. **Heliyon**, v. 3, p. 1-19, 2019.

AL-GHAMDI, A.; KHAN, K.A.; ANSARI, M.J.; ALMASAUDI, S.B.; AL-KAHTANI, S. Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 383-387, 2018.

ANDERSON, K.E.; CARROL, M.J.; SHEEHAN, T.; MOTT, B.M.; MAES, P.; CORBY-HARRIS, V. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 5904-5917, 2014.

AUDISIO, M.C.; SABATÉ, D.C.; BENÍTEZ-AHRENDTS, M.R. Effect of *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. **Beneficial Microbes**, v. 6, p. 687-695, 2015.

AUDISIO, M.A. Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the *Apis mellifera* L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, p 22-31, 2017.

BARBOSA, F.H.F.; DE LIMA BARBOSA, L.P.J.; BAMBIRRA, L.H.S.; ABURJAILE, F.F. Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, p. 11-21, 2011.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, v. 56, p. 663-667, 2001.

BJÖRKROTH, J.; KOORT, J. Reference Module in Food Science. **Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity**. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965008647?via%3Dihub>. Acesso em: 16 maio 2019.

BRUNO, L.M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Lácticas**. 2011. Brasília, DF. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/933486/1/doc336151.pdf>. Acesso em: 20 de maio 2019

CORTÉS-RODRÍGUEZ, V.; LIDIA, D.A.; PEREDO-LOVILLO, A.; HUMBERTO, H.S. Lactic Acid Bacteria Isolated From Vegetable Fermentations: Probiotic Characteristics. 2018. **Reference Module in Food Sciences**. p. 1-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22601-2> . Acesso em: 07 out. 2019.

COSTA, G.M.; PAULA M.M.; BARÃO, C.E.; KLOSOSKI, S.J.; BONAFÉ, E.G.; VISENTAINER, J.V.; CRUZ, A.G.; PIMENTEL, T.C., 2019. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. **International Dairy Journal**, v. 97, p. 139-148, 2019.

DAISLEY, B.A.; PITEK, A.P.; CHMIEL, J.A.; AL, K.F.; CHERNYSHOVA, A.M.; FARAGALLA, K.M.; BURTON, J.P.; THOMPSON, G.J.; REID, G. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. **The ISME Journal**, v. 14, p. 476-491, 2020.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. 2016. **Reference Module in Food Science**. Disponível em: [10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9). Acesso em: 05 maio 2020.

DEEPAK, V.; RAMACHANDRAN, S.; BALAHMAR, R.M.; PANDIAN, S.R.K.; SIVASUBRAMANIAM, S.D.; NELLAIHAH, H.; SUNDAR, K. In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from *Lactobacillus acidophilus* in colon cancer cell lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 52, p. 163-173, 2016.

DEMIRCI, T.; AKTAŞ, K.; SÖZERI, D.; ÖZTÜRK, H.I.; AKIN, N. Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 396-403, 2017.

DE MELO PEREIRA, G.V.; COELHO, B.O.; MAGALHÃES JÚNIOR, A.I.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C.R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 2060-2076, 2018.

DE MELO, F.H.C.; DANTAS, F.N.; MENEZES, D.; SOUSA, J.M.B.; LIMA, M.S.; BORGES, G.S.C.; SOUZA, E.L.; MAGNANI, M. Prebiotic activity of monofloral honeys produced by stingless bees in the semi-arid region of Brazilian Northeastern toward *Lactobacillus acidophilus* LA-05 and *Bifidobacterium lactis* BB-12. **Food Research International**, v. 128, p. 108-809, 2020.

DIEZ-GUTIÉRREZ, L.; VICENTE, L.V.; BARRÓN, L.J.R.; VILLARÁN, M.C.; CHÁVARRI, M. Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals Market. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 1-14, 2020.

DOMINGOS-LOPES, M.; NAGY, A.; ROSS, P.R.; GELENCSEÉR, E.; SILVA, C.C.G. Immunomodulatory activity of exopolysaccharide producing *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pico cheese. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p.235-243, 2017.

DONG, Z.X.; LI, H.Y.; CHEN, Y.F.; WANG, F.; DENG, X.Y.; LIN, L.B.; ZHANG, Q.L.; LI, J.L.; GUO, J. Colonization of the gut microbiota of honey bee (*Apis mellifera*) workers at different developmental stages. **Microbiological Research**, v. 231, p.1-12, 2020.

EIMANIFAR, A.; BROOKS, S.A.; BUSTAMANTE, T.; ELLIS, J.D. Population genomics and morphometric assignment of western honey bees (*Apis mellifera* L.) in the Republic of South Africa. **BMC Genomics**, v. 19, p. 615, 2018.

ENDO, A., TANAKA, N., OIKAWA, Y., OKADA, S., DICKS, L. Fructophilic Characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the Absence of an Alcohol/Acetaldehyde Dehydrogenase Gene (*adhE*). **Current Microbiology**, v. 68, p. 531-535, 2014.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

FAGHFOORI, Z.; GARGARI, B.P.; SABER, A.; SEYYEDI, M. Prophylactic effects of secretion metabolites of dairy lactobacilli through downregulation of ErbB-2 and ErbB-3 genes on colon cancer cells. **European Journal Cancer Prevention**, v. 29, p. 1-9, 2017.

FARIAS, D. P.; ARAÚJO, F.F.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORE, G.M. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. **Trends Food Science & Technology**, v. 93, p. 23-35, 2019.

FATTORINI, R., GLOVER, B.J. Molecular Mechanisms of Pollination Biology. *Annu. Review of Plant Biology*, v. 71, p. 487-515, 2020.

FELIS, G.E.; DELLAGIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*, v. 8, p. 44-61, 2005.

FERREIRA, E.L.; LENCIONI, C.; BENASSI, M.T.; BARTH, O.M. Descriptive sensory analysis and acceptance of singles bee honey. *Food Science Technology International*, v. 15, p. 251-258. 2009.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S., GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v. 109, p. 35-50, 2013.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 3-11, 2009.

GIBSON, G.R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M.E.; PRESCOTT, S.L.; REIMER, R.A.; SALMINEN, S.J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K.S.; CANI, P.D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology*, v. 14, p. 491-502, 2017.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILLI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, v 6, p. 1-8, 2010.

GLINSKI, Z.; JAROSZ, J. *Varroa jacobsoni* invasion and the level of cell free immunity in upright larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Folia Veterinaria*, v. 32, p. 39-42, 1988.

GOIS, G.C.; RODRIGUES, A.E.; DE LIMA, C.A.B.; SILVA, L.T. Composição do mel de *Apis mellifera*: Requisitos de qualidade. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 7, p. 137-147, 2013.

GOTCHEVA, V.; HRISTOZOVA, E.; HRISTOZOVA, T.; GUO, M. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast stains. *Food Biotechnology*, v. 16, p. 211-225, 2002.

GUARNER, F. **Probiotics and prebiotics**. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Retrieved. 2017. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>. Acesso em: 10 jan. 2020.

HE, C.; LIU, Y.; LIU, H.; ZHENG, X.; SHEN, G.; FENG, J. Compositional identification and authentication of Chinese honeys by 1H NMR combined with multivariate analysis. *International Food Research Journal*, v. 130, p. 108-936, 2020.

HMOOD, K.A.; HABEEB, A.H.; AL-MHNNA, K.I. Antioxidant role of *Lactobacillus* sp isolated from honey bee against histological effects of Ochratoxin in vivo. **Journal of Biology** v. 11, p. 67-80, 2019.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **International Food Research Journal**, v. 35, p. 109-116, 2002.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: as bactérias do ácido láctico do vinho – parte I. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 23, p. 81-96, 2008.

IRAPORDA, C.; RUBEL, I.A.; MANRIQUE, G.; ABRAHAM, A.G. Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. **Food Science and Technology**, v. 101, p. 738-746, 2019.

ISMAIL, B.; NAMPOOTHIRI, K.M. Exposition of antitumour activity of a chemically characterized exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. **Biologia**, v. 68, p. 1041-1047, 2013.

KENNAS, A.; AMELLAL-CHIBANE, H.; KESSAL, F.; HALLADJ, F. Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 19, p. 99-108, 2020.

KHANGWAL, I.; PRATYOOSH, S. Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. **Journal of Food Drug Anal**, v. 27, p. 649-656, 2019.

KHAN, K. A.; AL-GHAMDI, A.A.; GHRAH, H.A.; ANSARI, M.J.; ALI, H.; ALAMRI, S.A.; AL- KAHTANI, S.N.; ADGABA, N.; QASIM, M.; HAFEEZ, M. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 1-12, 2020.

KLAENHAMMER, T.R.; BARRANGOU, R.; BUCK, B.L.; AZCARATE-PERIL, M.A.; ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 29, p. 393-409, 2005.

KORCZ, E.; KERÉNYI, Z.; VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Functional Journal**, v. 9, p. 3057-3068, 2018.

KRAIMI, N.; DAWKINS, M.; GEBHARDT-HENRICH, S.G.; VELGE, P.; RYCHLIK, I.; VOLF, J.; CREACH, P.; SMITH, A.; COLLES, F.; LETERRIER, C. Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. **Physiology & Behavior**, v. 210, p. 1-12, 2019.

KUMAR, P.; SINGH, G.; SINGH, H. Impact of Insect Pollinators on Quantitative and Qualitative Improvement in Agricultural Crops: A Review. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v. 9, p. 2359-2367, 2020.

LEYVA SALAS, M.; MOUNIER, J.; VALENCE, F.; COTON, M.; THIERRY, A.; EMMANUEL COTON, E. Antifungal microbial agents for food biopreservation – A Review. **Microorganisms**, v. 5, p. 2-35, 2017.

LEYVA SALAS, M.; THIERRY, A.; LEMAÎTRE, M.; GARRIC, G.; HAREL-OGER, M.; CHATEL, M.; LÊ, S.; MOUNIER, J.; VALENCE, F.; COTON, E. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-18, 2018.

LI, P.; TAN, H.; XU, D.; YIN, F.; CHENG, Y.; ZHANG, X.; LIU, Y.; WANG, F. Effect and mechanisms of curdlan sulfate on inhibiting HBV infection and acting as an HB vaccine adjuvant. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 446-455, 2014.

LIMA, C.D.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

LONDON, L.; KUMAR, A.H.S.; WALL, R.; CASEY, P.G.; O'SULLIVAN, O.; SHANAHAN, F.; HILL, C.; COTTER, P.D.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; CAPLICE, N.M.; STANTON, C. Exopolysaccharide-producing probiotic Lactobacilli reduce sérum cholesterol and modify enteric microbiota in ApoE-deficient mice. **Journal of Nutrition**, v. 144, p. 1956-1962, 2014.

MA, W.; ZHENG, X.; LI, L.; SHEN, J.; LI, W.; GAO, Y. Changes in the gut microbiota of honey bees associated with jujube flower disease. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 198, p.1-9, 2020.

MAENO, S.; TANIZAWA, Y.; KANESAKI, Y.; KUBOTA, E.; KUMAR, H.; DICKS, L.; SALMINEN, S.; NAKAGAWA, J.; ARITA, M.; ENDO, A. Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, p. 516-526, 2016.

MAHMOUD, F.; MA'MOUN, S.; MOHAMAD, R.; SHAFI, A.E. Field Application of Honeybees' Endogenous Lactic Acid Bacteria for the Control of American Foulbrood Disease. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 19-82, 2019.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.R. A dynamics model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 287-296, 2005.

MARCHINI, L.C.; REIS, V.D.A.; MORETI, A.C.C.C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 949-953, 2006.

MARTINSON, V.G.; MOY, J.; MORAN, N.A. Establishment of characteristic intestinal bacteria during the development of the honeybee worker. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, v. 78, p. 2830-2840, 2012.

MELO, I.L.P.; FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 346- 53, 2009.

MENEZES, J.D.S.; MACIEL, L.F.; MIRANDA, M.S.; DRUZIAN, J.I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 233-242, 2010.

MCGUIRE, M.K.; MCGUIRE, M.A. Human Milk: Mother Natures Prototypical Probiotic Food? Adv. **Food Nutrition**, v. 6, p. 112-123, 2015.

MODRO, A.F.H.; MESSAGE, D.; LUZ, C.F.P.; MEIRA NETO, J.A.A. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1057-1065, 2007.

MOHANTY, D.; MISRA, S.; MOHAPATRA, S.; SAHU, P.S. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, v. 26, p. 152-160, 2018.

MOINEAU-JEAN, A.; CHAMPAGNE, C.P.; ROY, D.; RAYMOND, Y.; POINTE, G.L. Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. **International Dairy Journal**, v. 93, p. 35-44, 2019.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 189-197, 2006.

MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1012, 2015.

MOUSAVI, M.; HESHMATI, A.; GARMAKHANY, A.D.; VAHIDINIA, A.; TAHERI, M. Optimization of the viability of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical, textural and sensorial characteristics of flaxseed-enriched stirred probiotic yogurt by using response surface methodology. **LWT Food Science and Technology**, v. 102, p. 80-88, 2019.

MOZZI, F. **Lactic Acid Bacteria**. Encyclopedia Food Health, p. 501-508, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>. Acesso em: 05 maio 2019

MUÑOZ QUEZADA, S.; CHENOLL, E.; VIEITES, J.M.; GENOVÉS, S.; MALDONADO, J.; BERMÚDEZ-BRITO, M.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.J.; ROMERO, F.; SUÁREZ, A.; RAMÓN, D.; GIL, A. Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I- 4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 51-62, 2013.

- NEVES, A.P.M.; ALMEIDA, A.M.B.; MACHADO, A.V.; COSTA, R.O. Análise Físico-química e Microbiológica do Mel de Abelha. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 5, p. 14-18, 2015.
- NUTTER, J.; FRITZ, R.; IURLINA, M.O.; SAIZ, A.I. Effect of *Prosopis* sp. honey on the growth and fermentative ability of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus fermentum*. **LWT Food Science and Technology**, v. 70, p. 309-314, 2016.
- O'CONNOR; KUNIYOSHI, P.T.M.; OLIVEIRA, R.O.S.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P.D. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Biotechnololy**, v 61, p. 160-167, 2020.
- OLIVEIRA, C.P.; SILVA, J.A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde. **Revista Verde**, v. 6, p. 25-31, 2011.
- OLOFSSON, T.C.; VÁSQUEZ, A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. **Current Microbiology**, v. 57, p. 356-363, 2008.
- OLOFSSON, T.C.; VÁSQUEZ, A.; SAMMATARO, D.; MACHARIA, J. A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies; *Apis mellifera* (Buckfast), *A. m. scutellata*, *A. m. mellifera*, and *A. m. monticola*. **Apidologie**, v. 42, p. 1-4, 2011.
- OLOFSSON, T.C.; BUTLER, E.; MARKOWICZ, P.; LINDHOLM, C.; LARSSON, L.; VÁSQUEZ, A. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. **International Wound Journal**, v. 13, p. 668-679, 2014.
- OUIDDIR, M.; BETTACHE, G.; SALAS, M.L.; PAWTOWSKI, A.; DONOT, C.; BRAHIMI, S.; MABROUK, K.; COTON, E.; MOUNIER, J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. **Food Microbiology**, v. 82, p. 160-170, 2019.
- PASCUAL-MATÉ, A.; OSÉS, S.M.; MARCAZZAN, G.L.; GARDINI, S.; MUIÑO, M.A.F.; SANCHO, M.T. Sugar composition and sugar-related parameters of honeys from the northern Iberian Plateau. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 74, p. 34-43, 2018.
- PATTABHIRAMAIAH, M.; REDDY, M.S.; BRUECKNER, D. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. **International Journal of Environmental Science**, v. 2, p. 1135-1146, 2012.
- RUEDENAUER, F.A.; SYDOW, D.; SPAETHE, J.; SARA D.; LEONHARDT, S.D. Young bumblebees may rely on both direct pollen cues and early experience when foraging. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1615>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ROOBAB, U.; BATOOL, Z.; MANZOOR, M.F.; SHABBIR, M.A.; KHAN, M.R.; AADIL, R.M. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 17-28, 2020.

RUAS-MADIEDO, P. **Biosynthesis and Bioactivity of Exopolysaccharides Produced by Probiotic Bacteria**. Food oligosaccharides: Production, analysis and bioactivity, pp. 118-133, 2014. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/277701286_Food_Oligosaccharides_Production_Analysis_and_Bioactivity. Acesso em: 06 dez. 2020.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-15, 2006.

SAADAT, Y.R.; KHOSROUSHAHIB, A.Y.; GARGARI, B.P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 79-89, 2019.

SABER, A.; ALIPOUR, B.; FAGHFOORI, Z.; KHOSROUSHAHI, A.Y. Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, p. 96-115, 2017.

SAKANDAR, H.A.; KUBOW, S.; SADIQ, F.A. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. **LWT Food Science and Technology**, v. 104, p. 70-75, 2019.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691-697, 2010.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy food. **Journal of Dairy Sciences**, v. 83, p. 894-907, 2000.

SILVA, R.A.; MAIA, G.A.; DE SOUSA, P.H.M.; COSTA, J.C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p.113-120, 2006.

SILVA, W.P., PAZ, J.R.L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, p. 146-152, 2012.

TAJABADI, N.; MARDAN, M.; MANAP, M.Y.A.; SHUHAIMI, M.; MEIMANDIPOUR, A.; NATEGHI, L. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. **Apidologie**, v. 42, p. 642- 649, 2011.

TEUSINK, B.; MOLENAAR, D. Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. **Current Opinion in Systems Biology**, v. 6, p. 7-13, 2017.

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N.N.; CAVALHEIRO, C.P.; MILANI, L.I.G.; FRIES, L.L.M. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença

de sais biliare de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Instituto de Lactícios Cândido Tostes**, v. 67, p. 5-10, 2012.

VÁSQUEZ, A.; FORSGREN, E.; FRIES, I.; PAXTON, R.J.; FLABERG, E.; SZEKELY, L.; OLOFSSON, T.C. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. **PLoS One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO). **Probióticos e Prébióticos**. 2017. Disponível em:

[http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics and prebiotics-portuguese-2017.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics%20and%20prebiotics-portuguese-2017.pdf). Acessado em: 21 maio 2018.

YILDIZ, H., KARATAS, N. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41-46, 2018.

ZHANG, T.; JEONG, C.H.; CHENG, W.N.; BAE, H.; SEO, H.G.; PETRIELLO, M.C.; HAN., S.G. Moringa extract enhances the fermentative, textural, and bioactive properties of yogurt. **LWT Food Science and Technology**, v. 101, p. 276-284, 2018.

ARTIGO 2

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DE *Apis mellifera* E SEUS PRODUTOS

¹Artigo a ser reajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Food Microbiology*, em versão na língua inglesa.

Potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de *Apis mellifera* e seus produtos

Nayara Alves Reis^{1*}; Carlos Alfredo Lopes de Carvalho¹; Celso Gabriel Vinderola²; Norma Suely Evangelista-Barreto¹ and Geni da Silva Sodré¹

¹Center of Agricultural, Environmental and Biological Sciences, Federal University of Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Center, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil

²Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química. Santa Fé, Argentina

*Corresponding author: Nayara Alves Reis¹

E-mail: nayaraalves_bio@hotmail.com

Rua Rui Barbosa, 710, Center, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil

Resumo: As bactérias lácticas apresentam grande importância para a indústria de alimentos devido a sua aplicação como probióticos. Esta pesquisa teve como objetivo isolar e avaliar o potencial probiótico de bactérias lácticas do trato gastrointestinal, mel e pólen de *Apis mellifera*. As amostras foram obtidas no apiário localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os isolados foram selecionados quanto à coloração de Gram e atividade de catalase. As culturas lácticas foram testadas in vitro quanto a atividade antagônica contra os micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos: ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) e teste de tolerância ao pH ácido (2,0; 2,5; 3,0) e aos sais biliares (0,05%; 0,1% e 0,5%). As bactérias lácticas que apresentaram potencial probiótico foram identificadas por análise molecular. Um total de 39 bactérias isoladas apresentaram coloração Gram positiva e atividade catalase negativa. Desse total, 69,23% apresentaram inibição sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, 61,53% sobre *Enterococcus faecalis*, 51,28% sobre *Salmonella* Enteritidis, e 53,84% sobre *Listeria monocytogenes*. A resistência antimicrobiana foi observada para a vancomicina (33%) e gentamicina (30%). Cinco bactérias lácticas apresentaram crescimento em pH 3,0 e quatro em diferentes concentrações de sais biliares (0,05%, 0,1%, 0,5%). Todas as potenciais bactérias lácticas isoladas foram identificadas como *Apilactobacillus kunkeei*. Os resultados

mostraram o isolamento de bactérias lácticas potencialmente probióticas com capacidade para aplicação na produção e desenvolvimento de novos produtos funcionais.

Palavras-chave: biotecnologia apícola, trato gastrointestinal, mel, pólen.

Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* and its products

Abstract: Lactic acid bacteria are of great importance to the food industry due to their application as probiotics. This research aimed to isolate and evaluate the probiotic potential of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract, honey and *Apis mellifera* pollen. The samples were obtained from the apiary located at the Federal University of Recôncavo da Bahia. Isolates were selected for Gram stain and catalase activity. Lactic cultures were tested in vitro for antagonistic activity against the microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, antimicrobial susceptibility test: ampicillin (10 µg), amoxicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg) and acid pH tolerance test (2.0; 2.5; 3.0) and to bile salts (0.05%; 0.1% and 0.5%). Lactic acid bacteria that showed probiotic potential were identified by molecular analysis. A total of 39 isolated bacteria showed Gram positive staining and negative catalase activity. Of this total, 69.23% showed inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, 61.53% of *Enterococcus faecalis*, 51.28% of *Salmonella* Enteritidis, and 53.84% of *Listeria monocytogenes*. Antimicrobial resistance was observed for vancomycin (33%) and gentamicin (30%). Five lactic acid bacteria grew at pH 3.0 and four at different bile salt concentrations (0.05%, 0.1%, 0.5%). All potential lactic acid bacteria isolated were identified as *Apilactobacillus kunkeei*. The results showed the isolation of potentially probiotic lactic acid bacteria capable of being applied in the production and development of new functional products.

Keywords: beekeeping biotechnology, gastrointestinal tract, honey, pollen.

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como "micro-organismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro" (Fao/Who, 2001). Dentre os micro-organismos mais utilizados em alimentos probióticos, as bactérias lácticas (BAL) do gênero *Lactobacillus* se destacam, por serem reconhecidas como seguras para o consumo humano (Chen et al., 2017). Alguns gêneros como *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium*, e fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae* também tem sido utilizado como probióticos (Vinderola e Reinheimer, 2003; Rivera-Espinoza e Gallardo-Navarro, 2010).

No geral, para avaliar sua segurança e eficácia as cepas probióticas devem ser selecionadas com base na sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal, atividade antimicrobiana, propriedades benéficas à saúde, como atividade contra possíveis patógenos, além da viabilidade durante as operações de armazenamento (Fontana et al., 2013; Casarotti et al., 2014; Fazilah et al., 2018). A identificação de uma bactéria candidata a probiótico também deve ser um critério de seleção indispensável (Yavuzdurmaz e Harsa, 2007; Barbosa et al., 2011).

As bactérias lácticas contêm propriedades atrativas para a indústria alimentícia e da saúde (Audisio et al., 2011), demonstrando eficácia na conservação de alimentos e no controle de patógenos devido a produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas (Deegan et al., 2006; Fontana et al., 2013). Na criação de abelhas, a alimentação artificial suplementada com bactérias lácticas probióticas pode melhorar notavelmente a resistência à doença aumentando a imunidade do hospedeiro e regular a microbiota intestinal desses insetos (Khan et al., 2020).

Bactérias lácticas isoladas do mel "verde", mel que ainda não foi operculado, de *Apis mellifera* apresentaram forte atividade antimicrobiana contra patógenos graves multirresistentes de feridas crônicas em humanos (Olofsson et al., 2014). A bactéria *Apilactobacillus kunkeei* é dominante entre todas as outras microbiotas associadas às abelhas (Khan et al., 2020), essa bactéria produz substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, benzoato e proteínas com funções antimicrobianas (bacteriocinas), que protegem o hospedeiro de patógenos invasores (Al-Ghamdi et al., 2018).

Essas descobertas potencializam novos estudos sobre as BAL nas abelhas e seus produtos, uma vez que há considerável diversidade de micro-organismos associados as

espécies de abelhas e que esses micro-organismos podem variar em função da região geográfica, fatores ambientais, floração e quantidade de néctar (Tajabadi et al., 2011; Tajabadi et al., 2013).

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi isolar e avaliar o potencial probiótico de bactérias lácticas do trato gastrointestinal, mel e pólen de *A. mellifera*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e preparo das amostras

Amostras de mel “verde”, pólen e o trato gastrointestinal da *A. mellifera* foram coletadas no apiário experimental do Grupo de Pesquisa INSECTA (Núcleo de Estudos dos Insetos) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia (Latitude: 12° 40' 12" S; Longitude: 39° 06' 07" W; Altitude: 230 m), no período de agosto a outubro de 2018. As amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis (100 mL) e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do INSECTA na UFRB, onde foram desenvolvidos os experimentos.

As amostras foram coletadas de quatro colmeias diferentes, totalizando 12 amostras. Quatro amostras correspondiam ao mel “verde” (10 mL para cada amostra), quatro de pólen (10 g para cada amostra) e quatro do trato gastrointestinal (cinco intestinos por amostra), todas as amostras foram processadas separadamente, analisadas e manipuladas de forma asséptica para evitar contaminação.

2.2. Isolamento de bactérias lácticas

As abelhas foram inicialmente desinfetadas externamente com solução etanol 70% (v/v), seguido de três lavagens com água destilada e então dissecadas com auxílio de pinça previamente esterilizada. Foram utilizados cinco tratos gastrointestinal para cada amostra, que após retirados foram macerados e acondicionados em tubo Eppendorf para dar início ao processo de diluição seriada (Audisio et al., 2011; Pattabhiramaiah et al., 2012).

Para o isolamento das bactérias lácticas no pólen e do mel “verde”, retirou-se 10 g de cada amostra separadamente, onde foram homogeneizadas em 100 mL de água peptonada (0,1%) e diluídas sucessivamente (até 10^{-6}) utilizando o mesmo diluente. Em seguida, as

amostras foram plaqueadas em ágar MRS (De Man Rogosa e Sharpe - KASVI) acrescido de 0,004% de púrpura de bromocresol, 0,5% de carbonato de cálcio e incubadas microaerofilia a 37 °C por 48 horas (Rengpipat et al., 2008; Olofsson et al., 2014).

Após incubação, colônias típicas de bactérias lácticas (com brilho e cor amarela, indicativo da produção de ácido, devido a mudança na coloração do indicador ácido básico púrpura de bromocresol), foram selecionadas e avaliadas quanto à coloração de Gram e teste de catalase pela adição, em lâminas de vidro, de uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sobre o esfregaço a partir das colônias isoladas (Coeuret et al., 2003). As colônias típicas selecionadas foram subcultivadas em ágar MRS nas mesmas condições descritas acima e estriadas para obtenção de culturas puras. Em seguida, as culturas lácticas foram preservadas em caldo MRS acrescido de glicerol 20% e incubadas em freezer -20 °C para a realização da caracterização probiótica.

2.3. *Caracterização probiótica*

A cada teste de caracterização probiótica foi sendo realizado uma seleção das bactérias lácticas com os melhores resultados, assim apenas as melhores prosseguiram nas análises seguintes.

2.3.1. *Análise da atividade antagonista das bactérias lácticas*

A atividade inibitória das bactérias lácticas foi verificada conforme método descrito por Ryan et al. (1996). Microgotas de 5 µL de cada cultura láctica foram inoculadas em placas contendo ágar MRS por 24 horas a 37 °C. Após esse período uma sobrecamada de ágar BHI (BRAIN HEART INFUSION- KASVI) (0,7%), contendo separadamente os micro-organismos indicadores (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) foi adicionada sob a superfície das placas e incubada novamente por 24 horas a 37 °C. A atividade antimicrobiana foi observada pela formação do halo de inibição pelas bactérias lácticas sobre os micro-organismos indicadores. O espectro de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro e definido da seguinte forma: + fraca inibição (halos até 4 mm de diâmetro), ++ média inibição (halos de 5 a 9 mm de diâmetro) e +++ forte inibição (halos a partir de 10 mm de diâmetro) (Chioda et al., 2007).

2.3.2. *Determinação da suscetibilidade das bactérias lácticas a antimicrobianos*

A suscetibilidade das bactérias lácticas aos antimicrobianos foi avaliada pela metodologia de difusão de discos em ágar proposto pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) com algumas modificações. Os antimicrobianos testados foram escolhidos de acordo com a literatura científica e com base no uso em terapias humanas: ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin®). Para realização dos testes as culturas lácticas inoculadas em 5 mL de caldo MRS foram padronizadas para uma densidade óptica (D.O) 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL) a 625 nm. Em seguida foi utilizado um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, e então inoculada em placa com agar MRS para a aplicação dos discos antimicrobianos (CLSI, 2012). Após o período de incubação, o diâmetro do halo de inibição foi medido, com o auxílio de um paquímetro, e o resultado interpretado e comparado de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos de antimicrobianos, tornando possível classificar as bactérias lácticas em resistentes, moderadamente sensível ou sensível.

2.3.3. *Sobrevivência das bactérias lácticas expostas às condições de acidez e às diferentes concentrações de sais biliares*

As culturas lácticas foram ativadas em 5mL de caldo MRS. Após incubação à 37 °C por 24 horas, as amostras foram centrifugadas e o pellet foi utilizado para os diferentes tratamentos. Para verificar a resistência a acidez, as culturas lácticas (D.O 0,6 a 600 nm) foram inoculadas, separadamente, em caldo MRS com diferentes valores de pH (7 - controle; 2,0; 2,5; 3,0) ajustados com HCl (0,2 M) e incubadas a 37 °C por 3 horas. Alíquotas de cada cultura foram coletadas após o período de 3 horas, diluídas em solução salina (0,85%) e plaqueadas em agar MRS. A sobrevivência dos isolados nessas condições foi verificada pelo crescimento das colônias após 24 horas de incubação a 37 °C (Erkkilä e Petäjä, 2000; Pennacchia et al., 2004).

A verificação da viabilidade das culturas lácticas a diferentes concentrações de sais biliares (p/v) seguiu a metodologia anterior utilizando os seguintes tratamentos: 0,0% (controle); 0,05%; 0,1% e 0,5% (Erkkilä e Petäjä, 2000; Pennacchia et al., 2004).

2.4. Identificação genotípica das bactérias lácticas

2.4.1. Extração de DNA

Após o isolamento e caracterização do potencial probiótico, as culturas lácticas que apresentaram as melhores características foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA realizada e analisada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis - SC, Brazil). Amostras das culturas lácticas probióticas foram devidamente enviadas de acordo com o protocolo da empresa. Toda a metodologia utilizada para a análise molecular foi de acordo com o protocolo da empresa Neopropecta.

A extração de DNA das culturas lácticas foi realizada utilizando a técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil). O DNA foi quantificado utilizando o fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Após quantificação, o DNA foi diluído a 0,5 ng/ μ L e armazenado a -20 °C.

Utilizando *bag* estéril, uma alíquota de 25 g (ou mL) da amostra foi homogeneizada com 225 g (ou mL) de diluente e adicionada em meio rico em nutrientes. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 35 °C (+/- 1 °C) por 48 horas. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada utilizando a técnica de *beads* magnéticas (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil).

2.4.2. Sequenciamento das bactérias lácticas

A identificação das bactérias lácticas foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário, que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil). Foi realizada à amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando o equipamento MiSeq *Sequencing System* (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário que está em segredo industrial, intitulado Sentinel (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil).

Todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*clusters* e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (Neoprosecta MicrobiomeTechnologies, Brazil).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As abelhas são colonizadas por uma comunidade microbiana rica que são transferidas horizontalmente do ambiente onde vivem. Esses insetos e as bactérias lácticas co-evoluíram em dependência mútua entre si e a maioria dessas bactérias produzem proteínas extracelulares, que estão implicadas na atividade antimicrobiana, na interação do hospedeiro ou na formação de biofilme. Além disso, as bactérias lácticas na defesa de seu próprio nicho e de seu hospedeiro desempenham um papel importante na digestão dos alimentos e imunidade das abelhas (Khan et al., 2020).

As características fenotípicas tradicionais das bactérias lácticas como a morfologia das colônias e células, expressam a diversidade desse grupo de bactérias, podendo apresentar formato de bacilos, de cocos ou coco-bacilos (Settanni e Moschetti, 2010; Mozzi, 2016). No presente estudo foi observado dois tipos de morfologia celular das culturas lácticas, bacilos e cocos, sendo isoladas um total de 39 culturas lácticas da *A. mellifera* (seis do pólen, quatro do mel “verde” e 29 do trato gastrointestinal).

Em estudos sobre a diversidade e variabilidade da microbiota do trato gastrointestinal das abelhas sociais geralmente são encontradas, especialmente bactérias lácticas no formato de bacilos como relatado por Hmood et al. (2019). Ainda segundo os autores a análise do intestino de *A. mellifera* mostrou que a maioria das culturas lácticas isoladas pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, sendo 28,57% identificados como *Apilactobacillus kunkeei*, 15,71% para *Lactobacillus plantarum* e 14,28% para *Lactococcus lactis*.

O efeito antagônico das bactérias lácticas sobre os micro-organismos indicadores pode ser explicado pela capacidade que estas bactérias têm em produzir substâncias

antimicrobianas, como metabólitos secundários, tais como, ácidos orgânicos e bacteriocinas (Argyri et al., 2013; Sakandar et al., 2019). Outros mecanismos incluem competição por nutrientes e coagregação com patógenos (De Melo Pereira et al., 2018).

Nesse estudo, 69,23% das bactérias lácticas foram capazes de inibir *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, 61,53% *Enterococcus faecalis*, 51,28% *Salmonella* Enteritidis e 53,84% *Listeria monocytogenes* (Tabela 1). Apenas 23,63% das culturas lácticas não apresentaram atividade inibitória sobre nenhum dos micro-organismos indicadores.

Tabela 1. Atividade inibitória (mm) das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia de *Apis mellifera* sobre micro-organismos indicadores.

BACTÉRIAS LÁCTICAS	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES				
	EC	EF	LM	SA	SE
AM1	(+++) 22	(+++) 24	(+++) 25	(+++) 28	(+++) 29
AM2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AM3	(+++) 25	(+++) 29	(+++) 15	(+++) 21	(+++) 25
AM4	(+++) 23	(+++) 26	(+++) 30	(-)	(++) 6
AP1	(+++) 16	(-)	(+++) 32	(+++) 33	(+++) 37
AP2	(-)	(+++) 25	(-)	(+++) 25	(+++) 28
AP3	(+++) 18	(+++) 25	(-)	(+++) 26	(+++) 21
AP4	(+++) 28	(+++) 19	(+++) 22	(+++) 31	(+++) 22
AP5	(+++) 30	(+++) 22	(+++) 17	(+++) 18	(+++) 26
AP6	(+++) 34	(+++) 19	(+++) 33	(-)	(+++) 25
AI1	(+++) 27	(+++) 27	(-)	(-)	(+++) 27
AI2	(+++) 28	(+++) 25	(-)	(-)	(+++) 30
AI3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI5	(+++) 35	(+++) 30	(+++) 30	(+++) 31	(+++) 39
AI6	(+++) 30	(+++) 27	(+++) 25	(+++) 36	(+++) 27
AI7	(+++) 53	(+++) 31	(+++) 69	(+++) 64	(+++) 23
AI8	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++) 32
AI9	(-)	(-)	(-)	(-)	(+++) 23
AI10	(+++) 33	(+++) 13	(+++) 19	(+++) 29	(+++) 25
AI11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI12	(+++) 36	(+++) 17	(-)	(+++) 30	(+++) 11
AI13	(+++) 43	(+++) 16	(+++) 34	(+++) 32	(+++) 26
AI14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

AI16	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI17	(+++) 40	(+++) 22	(+++) 29	(+++) 30	(+++) 30
AI18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI19	(+++) 45	(+++) 27	(+++) 27	(+++) 34	(+++) 22
AI20	(+++) 15	(-)	(-)	(-)	(-)
AI21	(+++) 28	(-)	(-)	(-)	(-)
AI22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
AI23	(+++) 30	(+++) 25	(+++) 34	(-)	(+++) 26
AI24	(+++) 46	(+++) 27	(+++) 28	(+++) 34	(+++) 24
AI25	(+++) 40	(+++) 22	(+++) 31	(+++) 31	(+++) 27
AI26	(+++) 39	(+++) 20	(+++) 30	(-)	(+++) 13
AI27	(++) 7	(-)	(+++) 28	(+++) 21	(-)
AI28	(+++) 46	(+++) 28	(+++) 32	(++) 8	(+++) 27
AI29	(+++) 38	(+++) 27	(+++) 29	(+++) 41	(+++) 21

EC: *Escherichia coli* ATCC 25922; EF: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; LM: *Listeria monocytogenes* CERELA; SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300; SE: *Salmonella* Enteritidis

A: *Apis mellifera*; I: trato gastrointestinal; M: mel desoperculado; P: pólen

Padrão para medida de diâmetro dos halos de inibição: - negativo (não houve inibição); + fraca inibição (até 4 mm de diâmetro); ++ média inibição (de 5 a 9 mm de diâmetro); +++ forte inibição (a partir de 10 mm de diâmetro).

De acordo com a Tabela 1, verifica-se que as bactérias lácticas apresentaram capacidade de inibir importantes patógenos e por isso foram selecionadas como possíveis candidatas a probióticos. Das 39 culturas lácticas, 14 apresentaram forte atividade inibitória (halos maiores que 10 mm de diâmetro) contra todos os micro-organismos indicadores. Verificou-se que para alguns micro-organismos indicadores a inibição das bactérias lácticas foi maior que para outros micro-organismos indicadores.

Resultados semelhantes quanto a ação antagônica em diferentes gêneros de bactérias também tem sido relatada. Audisio et al. (2011) observaram que as bactérias lácticas isoladas do intestino de *A. mellifera* inibiram diferentes patógenos humanos de origem alimentar (*L. monocytogenes*, *E. coli* 0157: H7, *S. aureus* 29213 ATCC) e larvas de *Paenibacillus larvae* que causam doenças em crias das abelhas. A inibição sobre esses patógenos ocorreu devido a produção de ácido láctico e bacteriocinas. Esses dados correlacionam com a presente pesquisa, demonstrando que as bactérias lácticas são promissoras para uso como probióticos.

Endo e Salminen (2013), ao isolarem de larvas de abelha, pólen e mel verde de *A. mellifera*, bactérias lácticas frutofílicas (FLAB), relataram que *Apilactobacillus kunkeei* FF30-6 apresentou forte atividade inibitória contra *Melissococcus plutonius*, um patógeno que causa

a morte nas larvas das abelhas. Segundo esses autores, a atividade antagonista pode estar relacionada ao efeito sinérgico de ácidos e peptídeos antimicrobianos. As larvas de abelhas infectadas por *P. larvae* e alimentadas com *A. kunkeei* intestinais, isoladas de *A. mellifera jemenitica* reduziu a mortalidade, confirmando que a bactéria *A. kunkeei*, atuou estimulando o sistema imunológico das larvas, promovendo uma resposta mais eficiente contra a infecção pelo patógeno (Al-Ghamdi et al., 2018).

A capacidade em inibir micro-organismos patogênicos, demonstra o potencial antimicrobiano das bactérias lácticas isoladas e sua possível aplicação em apiários, possibilitando o fortalecimento das colmeias tendo em vista a situação do colapso das colônias de abelhas em todo o mundo.

Das 39 culturas isoladas inicialmente, 30 apresentaram atividade inibitória sobre os micro-organismos e por isso foram submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia de *Apis mellifera*.

ISOLADOS	ANTIMICROBIANOS					
	GEN	AMP	TET	AMO	VAN	CLO
AM1	S	S	S	S	M	S
AM3	R	S	S	S	M	S
AM4	R	S	S	S	R	S
AP1	M	S	S	S	R	S
AP2	S	S	S	S	S	S
AP3	M	S	S	S	M	S
AP4	S	S	S	S	S	S
AP5	M	S	S	S	M	S
AP6	S	S	S	S	M	S
AI1	S	S	S	S	S	S
AI2	R	S	S	S	R	S
AI5	R	S	S	S	S	S
AI6	R	S	S	S	M	S
AI7	R	S	S	S	M	S
AI8	R	S	S	S	M	S
AI9	S	S	S	S	R	S
AI10	S	S	M	S	S	S
AI12	S	S	S	S	R	S
AI13	S	S	S	S	M	S

AI17	M	S	S	S	M	S
AI19	M	S	S	S	M	S
AI20	M	S	M	S	R	S
AI21	R	S	S	S	R	S
AI23	S	S	S	S	R	S
AI24	S	S	S	S	S	S
AI25	M	S	S	S	R	S
AI26	R	S	S	S	R	S
AI27	S	S	S	S	S	S
AI28	S	S	S	S	S	S
AI29	M	S	S	S	S	S

A: *Apis mellifera*; I: trato gastrointestinal; M: mel desoperculado; P: pólen

AMP: ampicilina (10 µg); AMOX: amoxicilina (10 µg); CLO: cloranfenicol (30 µg); GEN: gentamicina (10 µg); TET: tetraciclina (30 µg); VAN: vancomicina (30 µg)

R: resistente; M: intermediário; S: sensível.

Foi observado maior percentual de resistência aos antimicrobianos, vancomicina (33%) e gentamicina (30%). Todas as cepas foram sensíveis aos antimicrobianos, ampicilina, amoxicilina e cloranfenicol.

As bactérias lácticas que apresentaram resistência aos antimicrobianos não devem ser utilizadas como probióticos em alimentos. Uma vez que, para garantir a seleção segura de uma cultura probiótica, deve ser levado em consideração seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Isso porque genes de resistência podem ser transferidos para outros microorganismos inclusive patogênicos (De Melo Pereira et al., 2018). Além disso, o uso descontrolado de antimicrobianos tem resultado na emergência de cepas multirresistentes (Al-Waili et al., 2013), sendo atualmente considerado um problema de saúde pública (Organização Mundial de Saúde, 2012).

As bactérias lácticas selecionadas demonstraram um perfil antimicrobiano seguro, tendo em vista seu uso como probiótico. Isso porque estas bactérias foram sensíveis a todos os seis antimicrobianos envolvidos no teste, sendo que era necessário que fossem sensíveis a apenas dois destes.

Os antimicrobianos têm sido proibidos na alimentação animal em muitos países, por isso cada vez mais substâncias naturais estão sendo exploradas para melhorar a saúde animal. O uso de bactérias benéficas é uma ferramenta muito importante contra patógenos e é comumente implementado na agricultura, aquicultura e na assistência à saúde humana e animal (Al-Ghamdi et al., 2018). Nesse sentido, o isolamento de novas bactérias lácticas,

capazes de produzir compostos antimicrobianos ainda não caracterizados, tem grande relevância, pois pode ser uma alternativa contra doenças infecciosas, especialmente com as limitações do uso de antimicrobianos em virtude da multirresistência bacteriana (Tajabadi et al., 2011; Olofsson et al., 2014).

Das 30 bactérias lácticas submetidas ao teste de suscetibilidade antimicrobiana, seis apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, e por isso foram selecionadas para os testes de tolerância à acidez e a diferentes concentrações de sais biliares.

Avaliando os resultados obtidos nos testes de sobrevivência a acidez, cinco isolados (83%) apresentaram crescimento após exposição em pH 3,0 (Tabela 3). Não houve crescimento das bactérias lácticas em pH 2 e 2,5. Enquanto 80% das bactérias lácticas cresceram após 3 horas de exposição a 0,05% 0,1% 0,5% de sais biliares (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do crescimento das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e dos produtos da colmeia de *Apis mellifera* em pH 3 e diferentes concentrações de sais biliares.

Bactéria láctica	Tolerância ao pH 3	Tolerância aos sais biliares		
		0,05%	0,1%	0,5%
AP2	+	+	+	-
AP4	+	+	+	+
AI1	+	+	+	+
AI24	+	+	+	+
AI27	-	Não submetida	Não submetida	Não submetida
AI28	+	+	+	+

A: *Apis mellifera*; I: intestino; P: pólen; Nenhum crescimento (-); crescimento (+); Não submetida: bactérias descartadas dos testes de sais biliares, pois não tiveram resultado satisfatório no teste de pH.

Resultados semelhantes foram encontrados por Sakandar et al. (2019), ao observarem a sobrevivência de bactérias lácticas em pH 3. Em outra pesquisa, as bactérias lácticas não apresentaram crescimento em pH 2, com baixo crescimento em pH 3, embora tenham apresentado crescimento máximo em pH 4 e 5 (Tallapragada et al., 2018). Segundo Lertworapreecha et al. (2011), a capacidade das bactérias lácticas em sobreviver a baixas condições de pH está relacionada com a presença da enzima ATPase em algumas espécies de bactérias.

A tolerância às concentrações de sais biliares também é outro fator importante para que as bactérias lácticas probióticas exerçam efeito benéfico no intestino do indivíduo. A atividade da enzima BSH (hidrolases de sais biliares, capaz de converter os sais biliares conjugados em sais biliares desconjugados) pode estar relacionada a sobrevivência de algumas bactérias lácticas a presença de sais biliares (Lertworapreecha et al., 2011; Argyri et al. 2013).

Nesta pesquisa as bactérias lácticas isoladas foram viáveis em pH 3 e às diferentes concentrações de sais biliares após 3 horas de exposição, demonstrando que estas bactérias podem suportar as condições do trato gastrointestinal do indivíduo, critério essencial para que o probiótico exerça seu efeito benéfico.

Entre as cinco culturas de bactérias lácticas, duas isoladas do pólen e três do trato gastrointestinal de *A. mellifera*, que apresentaram potencial probiótico foram identificadas genotipicamente, por análise das sequências do RNA ribossomal 16S, como *Apilactobacillus kunkeei*.

As bactérias pertencentes a essa espécie foram recentemente descritas e são isoladas, principalmente, de fontes ricas em frutose, incluindo flores, frutas, produtos fermentados à base de flores e frutas, alimentos com alto teor de frutose e no intestino das abelhas (Sakandar et al., 2019). Em estudos sobre a diversidade e variabilidade de espécies bacterianas no pólen e intestino das abelhas *A. mellifera*, observou-se que *A. kunkeei* é dominante entre todas as outras microbiotas associadas às abelhas (Hmood et al., 2019; Khan et al., 2020).

O efeito antimicrobiano de *A. kunkeei* foi citado em algumas pesquisas, demonstrando que essa bactéria tem um grande potencial antimicrobiano, produzindo um amplo espectro de metabólitos antimicrobianos como as bacteriocinas (Endo e Salminen, 2013; Al-Ghamdi et al., 2018). Salman e Saleh (2019) observaram que *A. kunkeei* pode ser utilizada no tratamento de feridas infeccionadas pelos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na pele de coelho.

Apilactobacillus kunkeei apresentaram bom papel protetor contra o efeito histológico da ocratoxina A, conseguindo degradar essa micotoxina (Hmood et al., 2019). Sakandar et al. (2019), observaram que *A. kunkeei* apresentou potencial probiótico em relação a atividade antipatogênica e sobrevivência a condições intestinais simuladas. Ainda segundo os autores as linhagens de *A. kunkeei* tem potencial para ser usadas na fermentação de cereais e prevenir o risco da síndrome do intestino irritável em humanos.

Além disso, a alimentação das colmeias de abelhas contendo essa espécie de lactobacilos pode ser eficaz na redução de perdas de colmeias relacionadas a patógenos enzoótico (Daisley et al., 2020).

O potencial antimicrobiano, as propriedades fisiológicas e os benefícios relatados na literatura científica elegem a bactéria láctica *A. kunkeei* um potencial probiótico para aplicação em diversos setores na indústria. As culturas lácticas isoladas na presente pesquisa, são achados importantes não apenas para a ciência, mas para a sociedade em geral tendo em vista as vantagens inéditas que podem advir das cepas de *A. kunkeei* com características únicas da região do Recôncavo da Bahia.

4. CONCLUSÃO

As bactérias lácticas probióticas isoladas do trato gastrointestinal, do mel e do pólen da *Apis mellifera*, foram identificadas como *Apilactobacillus kunkeei* sendo promissoras para aplicação como potencial probiótico. As cepas demonstraram sensibilidade aos antimicrobianos comumente usados na terapia humana, capacidade em sobreviver em pH ácido e a diferentes concentrações de sais biliares. Além disso, o forte efeito inibitório do *A. kunkeei* sobre importantes patógenos, demonstra que essa bactéria láctica produz metabólitos antimicrobianos que podem ser fontes potenciais de novos compostos antimicrobianos.

Este é o primeiro relato no Brasil de bactérias lácticas probióticas isoladas do trato gastrointestinal e pólen de *A. mellifera* da região do Recôncavo da Bahia. Testes adicionais são necessários para avaliar a segurança bem como a identificação dos metabólitos antimicrobianos produzidos pelas cepas de *A. kunkeei* isoladas nesse estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro por parte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum conflito de interesse declarado.

REFERÊNCIAS

- Al-Ghamdi, A., Khan, K.A., Ansari, M.J., Almasaudi, S.B., Al-Kahtani, S.N., 2018. Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. *Saudi J. Biol. Sci.* 25, 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.005>.
- Al-Waili, N., Al-Ghamdi, A., Ansari, M.J., Alattal, Y., Salom, K., Osman, A., 2013. Differences in Composition of Honey Samples and Their Impact on the Antimicrobial Activities against Drug Multiresistant Bacteria and Pathogenic Fungi. *Arch. Med. Res.* 44, 307-316. [10.1016/j.arcmed.2013.04.009](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.04.009).
- Argyri, A.A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E. Z., Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282-291. [10.1016/j.fm.2012.10.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005).
- Audisio, M.C. Torres, M.J., Sabaté, D.C., Ibarguren, C., Apella, M.C., 2011. Properties of diferente lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol. Res.* 166, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003>.
- Barbosa, F.H.F., De Lima Barbosa, L.P., Bambirra, L.H.S., Aburjaile, F.F., 2011. Probióticos – microrganismos a favor da vida. *Rev. Biol. Ciênc. Terra*, 11, 11-21. ISSN: 1519-5228.
- Casarotti, S.N., Monteiro, D.A., Moretti, M.M.S., Penna, A.L.B., 2014. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Int. Food Res. J.* 59, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.068>.
- Centers for Disease Control, 2018. *Listeria Outbreaks*. <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html/>. (Acesso em 20 de maio de 2019).
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H., Zhao, G., 2017. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int. J. Food Prop.* 20, 316-330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>.
- Chioda, T.P., Schocken-Iturrino, R.P., Garcia, G.R., Pigatto, C.P., Ribeiro, C.A.M., Ragazzani, A.V.F., 2007. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciênc. Rural*, 37, 583-585. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000200048>.
- Clinical Laboratory Standards Institute, 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility tenting: twenty-second informational supplement*. 31, 1- 186. file:///C:/Users/Nay/Downloads/previews_CLSI_M02A11E_M100S22E_pre.pdf (acesso em 20 de maio de 2017).
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2003. Isolation, characterization and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83, 269-306. [10.1051/lait:2003019](https://doi.org/10.1051/lait:2003019).

- Daisley, B.A., Pitek, A.P., Chmiel, J.A., Al, K.F., Chernyshova, A.M., Faragalla, A.M., Burton, J.P., Thompson, G.J., Reid, G., 2020. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *ISME J.*, 14, 476-491. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelflife extension. *Int. Dairy J.*, 6, 1058-1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>.
- De Melo Pereira, G.V., Coelho, B.O., Magalhães Júnior, A.I., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R., 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol. Adv.* 36, 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>.
- Endo, A., Salminen, S., 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 444-448. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002>.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55, 97-300. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00156-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00156-4).
- Fazilah, N.F., Ariff, A.B., Khayat, M.E., Rios-Solis, L., Halim, M., 2018. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J. Funct.* 48, 387-399. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.039>.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gil, A., 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* 109, 35-50. [10.1017/S0007114512004011](https://doi.org/10.1017/S0007114512004011).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2001. *Report Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf> (acesso em 10 de março de 2017).
- Hmood, K.A., Habeeb, A.H., Al-Mhanna, K.I., 2019. Antioxidant role of *Lactobacillus* sp isolated from honey bee against histological effects of Ochratoxin in vivo. *Al-Kufa University J. Biol.* 11, 67-80. Online ISSN: 2311-6544.
- Janashia, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Hwanhlem, N., Bakuradze, N., Chanishvili, N., Haertlé, T., 2016. Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. *Ann. Agrar. Sci.* 14, 177-181. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.07.002>.
- Khan, K.A., Al-Ghamdi, A.A., Ghramh, H.A., Ansari, M.J., Ali, H., Alamri, S.A., Al-Kahtani, S.A., Adgaba, N., Qasim, M., Hafeez, M., 2020. Structural diversity and functional

variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microb. Pathog.* 138, 103793. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103793>.

Lertworapreecha, L., Poonsuk, K., Chalermchakit, T., 2011. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the in vitro properties. <https://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/33-1/0125-3395-33-1-9-14.pdf> (acesso em 20 de maio de 2019).

Maldonado, N.C., Fico seco, C.A., Mansilla, F.I., Melián, C., Hébert, E.M., Vignolo, G.M., Nader-Macías, M.E.F., 2018. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livest. Sci.* 212, 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.04.003>.

Mozzi, F., 2016. Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, 501-508. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1> (acesso em 20 de maio de 2019).

Olofsson, T.C., Butler, E., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A., 2014. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey’s antimicrobial and therapeutic activities. *Int. Wound J.* 13, 668-679. 10.1111/iwj.12345.

Organização Mundial da Saúde, 2012. *A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções para ação*. http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf (acesso em 20 de abril de 2019).

Pattabhiramaiah, M., Reddy, M.S., Brueckner, D., 2012. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *Int. J. Environ. Sci.* 2, 1135-1143. 10.6088/ijes.00202030002.

Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.* 67, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.11.003>.

Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S., 2008. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquac. Res.* 39, 134-143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01864>.

Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y., 2010. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* 27, 1-11. 10.1016/j.fm.2008.06.008.

Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., Ross, R.P., 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 612-619. 10.1128/AEM.62.2.612-619.1996.

Sakandar, H.A., Kubow, S., Sadiq, F.A., 2019. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT*, 104, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038>.

- Salman, S.M., Saleh, G.M., 2019. The Role of Fructophilic Lactic Acid Bacteria in the Restoration of Infected Wounds and IL-17 Level in Rabbits. *Iraqi J. Sci.* 60, 2371-2382. <http://scbaghdad.edu.iq/eijs/index.php/eijs/article/view/1183>.
- Settanni, L., Moschetti, G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27, 691-697. 10.1016/j.fm.2010.05.023.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Jahromi, M.F., Ho, Y. W., 2014. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Res. Int.* 2014, 1-16. 10.1155/2014/927268.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L., 2011. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 42, 642-649. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13592-011-0069-x>.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, M., Mustafa, F., Bahreini, R., Manap, M.Y.A., 2013. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Braz. J. Microbiol.* 44, 717-722. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300008>.
- Tallapragada, P., Bhargavi, R., Priyanka, P.R., Niranjana, N.R., Pavitra, P.V., 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *J. Genetic Eng. Biotechnol.* 16, 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res.* 36, 895-904. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X).
- Yavuzdurmaz, H., Harsa, S., 2007. *Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk.* <https://core.ac.uk/download/pdf/324141546.pdf> (acesso em 20 de maio de 2019).

ARTIGO 3

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS ISOLADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL, MEL E PÓLEN DE *Melipona scutellaris* L.

¹Artigo a ser reajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico *Journal of Apicultural Research*, em versão na língua inglesa.

Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal, mel e pólen de *Melipona scutellaris* L.

Nayara Alves Reis^{1*}; Carlos Alfredo Lopes de Carvalho¹; Celso Gabriel Vinderola²; Norma Suely Evangelista-Barreto¹ and Geni da Silva Sodré¹

¹Center of Agricultural, Environmental and Biological Sciences, Federal University of Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Center, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil

²Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química. Santa Fé, Argentina

*Corresponding author: Nayara Alves Reis¹

E-mail: nayaraalves_bio@hotmail.com

Rua Rui Barbosa, 710, Center, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brazil

RESUMO: O objetivo dessa pesquisa foi isolar, caracterizar e identificar bactérias lácticas do trato gastrointestinal, mel e pólen de abelhas *Melipona scutellaris*, com ênfase nas propriedades probióticas. As amostras foram obtidas no meliponário localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Os isolados foram selecionados quanto à coloração de Gram e atividade de catalase. As culturas lácticas foram testadas in vitro quanto a capacidade em inibir *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e *Escherichia coli* ATCC 25922, suscetibilidade a antimicrobianos, tolerância a acidez e a presença de sais biliares. Ao final as culturas potencialmente probióticas foram identificadas geneticamente por meio do sequenciamento do 16S rDNA. Um total de 16 micro-organismos apresentaram coloração Gram positiva e atividade de catalase negativa. Quanto a ação antagônica, 56,25% das bactérias lácticas inibiram a presença de *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis, 62,5% *L. monocytogenes* e 75% *S. aureus* e *E. faecalis*. Todos os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina e cloranfenicol, no entanto 58,33% foram resistentes à vancomicina. Três bactérias lácticas apresentaram crescimento em pH 3,0, e também foi observado crescimento nas concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,5% de sais biliares. As bactérias lácticas com potencial probiótico foram identificadas como *Enterococcus faecium*. Esses resultados demonstram isolamento de bactérias lácticas em abelhas da espécie *M. Scutellaris*.

Palavras-chave: culturas lácticas, bactérias probióticas, meliponicultura, microbiota intestinal, *Enterococcus*.

Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract, honey and pollen of *Melipona scutellaris* L.

ABSTRACT: The aim of this research was to isolate, characterize and identify lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract, honey and bee pollen *Melipona scutellaris*, with emphasis on probiotic properties. The samples were obtained from the meliponary located at the Federal University of Recôncavo da Bahia. Isolates were selected for Gram stain and catalase activity. Lactic cultures were tested in vitro for their ability to inhibit *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Escherichia coli* ATCC 25922, susceptibility to antimicrobials, tolerance to acidity and the presence of bile salts. In the end, potentially probiotic cultures were genetically identified through 16S rDNA sequencing. A total of 16 microorganisms showed Gram positive staining and catalase negative activity. As for the antagonistic action, 56.25% of lactic acid bacteria inhibited the presence of *E. coli* and *S. Enteritidis*, 62.5% *L. monocytogenes* and 75% *S. aureus* and *E. faecalis*. All isolates were sensitive to antimicrobials: ampicillin, amoxicillin and chloramphenicol, however 58.33% were resistant to vancomycin. Three lactic acid bacteria grew at pH 3.0, and growth was also observed at concentrations of 0.05%, 0.5% and 0.1% of bile salts. Lactic acid bacteria with probiotic potential were identified as *Enterococcus faecium*. These results demonstrate that it is possible to isolate lactic acid bacteria from bees of the species *M. Scutellaris*.

Keywords: lactic acid cultures, probiotic bacteria, meliponiculture, intestinal microbiota.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias probióticas têm sido amplamente estudadas devido ao crescente interesse no seu uso para produção de alimentos funcionais (MALLAPPA et al., 2019). Apesar de existirem muitas cepas probióticas comerciais, a detecção de probióticos ainda não relatados pode ser importante para o levantamento de novos questionamentos na prevenção de doenças existentes e emergentes (PATTABHIRAMAIAH; REDDY; BRUECKNER, 2012). Uma vez que, novas cepas probióticas podem trazer consigo características únicas, como a produção de metabólitos antimicrobianos que ainda não foram relatados e que podem ser extremamente valiosos no tratamento de doenças e infecções, especialmente aquelas onde é verificada a emergência de bactérias multirresistentes.

Estudos sobre micro-organismos probióticos e seus efeitos benéficos tem sido documentado, contra um grande número de infecções intestinais, respiratórias e urogenitais. Além disso, cada micro-organismo apresenta características probióticas próprias, assim como seus efeitos benéficos (SHOKRYAZDAN et al., 2014). Nesse sentido, pesquisas estão sendo continuamente dedicadas à seleção e caracterização de novas espécies probióticas (LONDON et al., 2014; DOMINGO-LOPES et al., 2017; SABER et al., 2017; ADESULU-DAHUNSI; SANNI; JEYARAM, 2018; AGUILAR-TOALA et al., 2018; DE MELO PEREIRA et al., 2018; KORCZ; KERÉNYI; VARGA, 2018; SAADAT; KHOSROUSHAHIB; GARGARI, 2019).

Estudos relatam que um grupo especial de micro-organismos tem garantido seu espaço como potenciais probióticos. O destaque para as bactérias lácticas não é à toa, pois sua ação no organismo hospedeiro tem sido relatada: atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-osteoporótica, redução do ganho de peso, alívio dos sintomas clínicos da intolerância à lactose, redução dos níveis séricos de glicose e colesterol total (PETROVA; PETROV 2011; YU, et al., 2013; EVIVIE, et al., 2017; OAK; JHA, 2018; AMINLARI, 2019; LEE; KIM, 2019; ZOMMITI, et al., 2019).

Os gêneros mais utilizados em alimentos probióticos são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (CHEN et al., 2017), bactérias que apresentam o status GRAS (geralmente reconhecidos como seguros). Apesar disso, os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Propionibacterium*, e fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae* também têm sido utilizados (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

O isolamento de novas bactérias lácticas, capazes de produzir compostos antimicrobianos ainda não caracterizados, tem grande relevância, pois podem ser uma alternativa contra doenças infecciosas, uma vez que, o uso de antibióticos tem sido limitado devido ao aumento da resistência bacteriana (TAJABADI et al., 2011; OLOFSSON et al., 2014), que envolve a seleção de novas linhagens com propriedades funcionais diferentes e específicas. Geralmente esses micro-organismos probióticos são isolados de seres humanos, no entanto, têm sido consideradas novas fontes de isolamento, como laticínios, frutas, grãos e resíduos (EL-MABROK et al., 2012; SIDDIQEE et al., 2012; ZENDO, 2013; PRADO et al., 2015; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2016; SORNPLANG; PIYADEATSOONTORN, 2016; FIORDA et al., 2017; PLESSAS et al., 2017). Além desses ambientes, o isolamento de bactérias lácticas com potencial probiótico tem sido relatado em abelhas e produtos da colmeia (OLOFSSON et al., 2014; AUDISIO; SABATÉ; BENÍTEZ-AHRENDTS, 2015; HMOOD; HABEEB; AL-MHNNA, 2019).

Alguns critérios devem ser considerados para seleção de cepas probióticas, principalmente no que se refere a segurança e eficácia do micro-organismo. Nesse sentido, a identificação de uma bactéria candidata a probiótico, assim como a sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal, atividade antimicrobiana, propriedades benéficas à saúde, como atividade contra possíveis patógenos e viabilidade durante as operações de armazenamento devem ser avaliadas (BARBOSA, 2011; FONTANA et al., 2013; CASAROTTI et al., 2014; FAZILAH et al., 2018).

Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi isolar, caracterizar e identificar bactérias lácticas do trato gastrointestinal, mel e pólen de abelhas *Melipona scutellaris*, com ênfase nas propriedades probióticas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e preparo das amostras

As amostras de mel “verde” e o trato gastrointestinal de *Melipona scutellaris* foram coletadas no meliponário experimental do Grupo de Pesquisa INSECTA (Núcleo de Estudos dos Insetos) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia (Latitude: 12° 39'35” S; Longitude: 39° 05' 08” W; Altitude: 213 m), no período de

agosto a outubro de 2018. As amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis (100 mL) e transportadas para o Laboratório de Microbiologia do INSECTA na UFRB, onde foram desenvolvidos os experimentos.

As amostras foram coletadas de quatro colmeias diferentes, totalizando 8 amostras. Quatro amostras correspondiam ao mel “verde” (10 mL para cada amostra) e quatro do trato gastrointestinal (cinco intestinos por amostra), todas as amostras foram processadas separadamente, analisadas e manipuladas de forma asséptica para evitar contaminação.

2.2. *Isolamento de bactérias lácticas*

As abelhas foram inicialmente desinfetadas externamente com solução etanol 70% (v/v), seguido de três lavagens com água destilada e então dissecadas com auxílio de pinça previamente esterilizada. Foram utilizados cinco tratos gastrointestinal para cada amostra, que após retirados foram macerados e acondicionados em tubo Eppendorf para dar início ao processo de diluição seriada (AUDISIO et al., 2011; PATTABHIRAMAIAH et al., 2012).

Para o isolamento das bactérias lácticas no mel “verde”, retirou-se 10 mL de cada amostra separadamente, onde foram homogeneizadas em 100 mL de água peptonada (0,1%) e diluídas sucessivamente (até 10^{-6}) utilizando o mesmo diluente. Em seguida, as amostras foram plaqueadas em ágar MRS (De Man Rogosa e Sharpe - KASVI) acrescido de 0,004% de púrpura de bromocresol, 0,5% de carbonato de cálcio e incubadas microaerofilia a 37 °C por 48 horas (RENGPIPAT et al., 2008; OLOFSSON et al., 2014).

Após incubação, colônias típicas de bactérias lácticas (com brilho e cor amarela, indicativo da produção de ácido, devido a mudança na coloração do indicador ácido básico púrpura de bromocresol), foram selecionadas e avaliadas quanto à coloração de Gram e teste de catalase pela adição, em lâminas de vidro, de uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre o esfregaço a partir das colônias isoladas (COEURET et al., 2003). As colônias típicas selecionadas foram subcultivadas em ágar MRS nas mesmas condições descritas acima e estriadas para obtenção de culturas puras. Em seguida, as culturas lácticas foram preservadas em caldo MRS acrescido de glicerol 20% e incubadas em freezer -20 °C para a realização da caracterização probiótica.

2.3. Caracterização probiótica

A cada teste de caracterização probiótica foi sendo realizado uma seleção das bactérias lácticas com os melhores resultados e prosseguiram nas análises seguintes.

2.3.1. Análise da atividade antagonista das bactérias lácticas

A atividade inibitória das bactérias lácticas foi verificada conforme método descrito por Ryan et al. (1996). Microgotas de 5 µL de cada cultura láctica foram inoculadas em placas contendo agar MRS por 24 horas a 37 °C. Após esse período uma sobrecamada de agar BHI (BRAIN HEART INFUSION- KASVI) (0,7%), contendo separadamente os micro-organismos indicadores (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* CERELA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella* Enteritidis e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) foi adicionada sob a superfície das placas e incubada novamente por 24 horas a 37 °C. A atividade antimicrobiana foi observada pela formação do halo de inibição pelas bactérias lácticas sobre os micro-organismos indicadores. O espectro de inibição foi medido com auxílio de um paquímetro e definido da seguinte forma: + fraca inibição (halos até 4 mm de diâmetro), ++ média inibição (halos de 5 a 9 mm de diâmetro) e +++ forte inibição (halos a partir de 10 mm de diâmetro) (CHIODA et al., 2007).

2.3.2. Determinação da suscetibilidade das bactérias lácticas a antimicrobianos

A suscetibilidade das bactérias lácticas aos antimicrobianos foi avaliada pela metodologia de difusão de discos em ágar proposto pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) com algumas modificações. Os antimicrobianos testados foram escolhidos de acordo com a literatura científica e com base no uso em terapias humanas: ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin®). Para realização dos testes as culturas lácticas inoculadas em 5 mL de caldo MRS foram padronizadas para uma densidade óptica (D.O) 0,08 a 0,10 (10⁸ UFC/mL) a 625 nm. Em seguida foi utilizado um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, e então inoculada em placa com agar MRS para a aplicação dos discos antimicrobianos (CLSI, 2012). Após o período de incubação, o diâmetro do halo de inibição foi medido, com o auxílio de um paquímetro, e o resultado interpretado e comparado de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos de antimicrobianos, tornando possível classificar as bactérias lácticas em resistentes, moderadamente sensível ou sensível.

2.3.3. *Sobrevivência das bactérias lácticas expostas às condições de acidez e às diferentes concentrações de sais biliares*

As culturas lácticas foram ativadas em 5mL de caldo MRS. Após incubação à 37 °C por 24 horas, as amostras foram centrifugadas e o pellet foi utilizado para os diferentes tratamentos. Para verificar a resistência a acidez, as culturas lácticas (D.O 0,6 a 600 nm) foram inoculadas, separadamente, em caldo MRS com diferentes valores de pH (7 - controle; 2,0; 2,5; 3,0) ajustados com HCl (0,2 M) e incubadas a 37 °C por 3 horas. Alíquotas de cada cultura foram coletadas após o período de 3 horas, diluídas em solução salina (0,85%) e plaqueadas em agar MRS. A sobrevivência dos isolados nessas condições foi verificada pelo crescimento das colônias após 24 horas de incubação a 37 °C (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).

A verificação da viabilidade das culturas lácticas a diferentes concentrações de sais biliares (p/v) seguiu a metodologia anterior utilizando os seguintes tratamentos: 0,0% (controle); 0,05%; 0,1% e 0,5% (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).

2.4. *Identificação genotípica das bactérias lácticas*

2.4.1. *Extração de DNA*

Após o isolamento e caracterização do potencial probiótico, as culturas lácticas que apresentaram as melhores características foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA realizada e analisada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis - SC, Brazil). Amostras das culturas lácticas probióticas foram devidamente enviadas de acordo com o protocolo da empresa. Toda a metodologia utilizada para a análise molecular foi de acordo com o protocolo da empresa Neopropecta.

A extração de DNA das culturas lácticas foi realizada utilizando a técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário que está em segredo industrial (Neopropecta Microbiome Technologies, Brazil). O DNA foi quantificado utilizando o fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Após quantificação, o DNA foi diluído a 0,5 ng/μL e armazenado a -20 °C.

Utilizando *bag* estéril, uma alíquota de 25 g (ou mL) da amostra foi homogeneizada com 225 g (ou mL) de diluente e adicionada em meio rico em nutrientes. A incubação foi

realizada em estufa bacteriológica a 35 °C (+/- 1 °C) por 48 horas. Posteriormente, a extração de DNA foi realizada utilizando a técnica de *beads* magnéticas (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil).

2.4.2. Sequenciamento das bactérias lácticas

A identificação das bactérias lácticas foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário, que está em segredo industrial (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil). Foi realizada à amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando o equipamento MiSeq *Sequencing System* (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário que está em segredo industrial, intitulado Sentinel (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brazil).

Todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*clusters* e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (Neoprosecta MicrobiomeTechnologies, Brazil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias lácticas são caracterizadas por serem Gram-positivas e com morfologia variada que inclui cocos, cocobacilos ou bacilos (FILIPPIS; PASOLLI; ERCOLINI, 2020). A triagem inicial realizada em aproximadamente 80 colônias de bactérias apresentou como resultado final um total de 16 micro-organismos (12 isolados provenientes do trato

gastrointestinal e quatro do mel “verde”) com coloração Gram positiva e atividade de catalase negativa, características típicas de bactérias do ácido láctico.

Os resultados estão de acordo com diferentes trabalhos que isolaram bactérias lácticas do trato gastrointestinal (AUDISIO et al., 2011; MCFREDERICK; VUONG; ROTHMAN, 2018) e mel de abelhas (ROKOP; HORTON; NEWTON, 2015; JANASHIA et al., 2016). As bactérias lácticas dominam esses ambientes, pois encontram condições favoráveis para a sua multiplicação, no intestino condições microaerófilas com temperatura ideal de 35°C, e no mel a presença de açúcares (NOWAK; NOWAK; LESKA, 2021).

A relação simbiótica entre as bactérias lácticas e as abelhas confere importantes funções na microbiota intestinal das abelhas, refletindo diretamente na saúde desses insetos tão importantes para a polinização e agricultura. A microbiota do trato gastrointestinal das abelhas realiza mecanismos bioquímicos e fisiológicos, incluindo a produção de metabólitos, e a indução de respostas imunológicas que garante a proteção das abelhas. No geral a microbiota intestinal sintetiza substâncias nutricionais essenciais, aumentam a eficiência da digestão e auxiliam os insetos na absorção de nutrientes (NOWAK; NOWAK; LESKA, 2021).

Apesar disso, sabe-se que a composição microbiana do trato gastrointestinal das abelhas pode mudar dependendo dos fatores externos, como variação da localização geográfica, espécie da abelha, sazonalidade, e dieta (NOWAK; NOWAK; LESKA, 2021). Para Ellegaard et al. (2020) a microbiota intestinal de duas espécies de abelhas apresenta os mesmos filotipos, porém a análise metagenômica mostra que as comunidades bacterianas intestinais são específicas para cada hospedeiro. Somado a isso os efeitos dos micro-organismos presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro é dependente das características da espécie da bactéria (NOWAK; NOWAK; LESKA, 2021).

Foi relatado que abelhas sociais sem ferrão abrigam até 50 novas espécies de bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (VÁSQUEZ et al., 2012). No entanto, as características das bactérias lácticas de abelhas sociais sem ferrão no Brasil ainda são desconhecidas.

Alguns relatos indicam que a microbiota intestinal destes insetos pode torná-los mais resistentes a ação de inseticidas (JING; QI; WANG, 2020) e inibir a presença de patógenos potenciais que contribuem para o colapso das colônias, como *Paenibacillus*, *Melissococcus plutonius*, *Serratia marcescens*, *Ascospaera apis* e *Nosema* sp. (WU et al., 2014; VAHEDI-

SHAHANDASHTI et al., 2017; ARREDONDO et al., 2018; FÜNFFHAUS; EBELING; GENERSCH, 2018; NOWAK, I.; NOWAK, A.; LESKA, 2020; PEGHAIRE et al., 2020).

Esses pequenos insetos movimentam milhões de dólares em países como os Estados Unidos, devido aos serviços que prestam, assim como na produção de produtos da colmeia (ZHENG et al., 2017). Nesse sentido o estudo e desenvolvimento de estratégias e produtos que vise o melhor desempenho e fortalecimento das abelhas é um bom empreendimento, considerando a importância desses animais na agricultura na produção de diversas culturas e nos produtos da colmeia.

Com relação ao teste de antagonismo, foi constatado que 75% das bactérias lácticas apresentaram inibição contra *E. faecalis* e *S. aureus*, 62,5% sobre *L. monocytogenes*, e 56,25% sobre *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade inibitória (mm) das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e mel “verde” de *Melipona scutellaris* sobre micro-organismos indicadores.

BACTÉRIAS LÁCTICAS	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES*				
	EC	EF	LM	SA	SE
MI1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MI2	(+++) 25	(++) 9	(+++) 25	(+++) 31	(++) 7
MI3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MI4	(+++) 19	(+++) 32	(-)	(+++) 22	(+++) 36
MI5	(-)	(+++) 14	(-)	(+++) 24	(-)
MI6	(+++) 28	(+++) 13	(+++) 16	(+++) 33	(+++) 11
MV7	(+++) 34	(+++) 15	(+++) 20	(+++) 30	(-)
MV8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MV9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
MV10	(+++) 31	(+++) 29	(+++) 19	(+++) 27	(-)
MI11	(+++) 30	(++) 9	(+++) 34	(+++) 30	(++) 8
MI12	(+++) 30	(+++) 12	(+++) 28	(+++) 27	(+++) 11
MI13	(+++) 24	(++) 8	(+++) 31	(+++) 29	(++) 8
MI14	(-)	(+++) 16	(+++) 29	(+++) 29	(+++) 15
MI15	(-)	(++) 8	(+++) 34	(+++) 23	(+++) 14
MI16	(+++) 31	(++) 5	(+++) 24	(+++) 28	(+) 4

EC: *Escherichia coli* ATCC 25922; EF: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; LM: *Listeria monocytogenes* CERELA; SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 43300; SE: *Salmonella* Enteritidis

M: *Melipona scutellaris*; I: trato gastrointestinal; V: mel verde

Padrão para medida de diâmetro dos halos de inibição: - negativo (não houve inibição); + fraca inibição (até 4 mm de diâmetro); ++ média inibição (de 5 a 9 mm de diâmetro); +++ forte inibição (a partir de 10 mm de diâmetro).

Para uma bactéria láctica ser considerada um probiótico é necessário ter uma série de características. A identificação de cepas, a segurança, a tolerância ao estresse gastrointestinal, a capacidade de aderência ao epitélio intestinal, e atividade antimicrobiana estão entre os principais testes para a triagem de cepas probióticas (PEREIRA et al., 2018).

O resultado da atividade inibitória sobre os micro-organismos indicadores, mostra que as bactérias isoladas apresentam potencial para serem utilizadas na indústria, principalmente como bioconservantes, devido ao seu amplo espectro de inibição (ISLAM et al., 2020). Segundo Sindi et al. (2020), os gêneros *Escherichia*, *Listeria* e *Salmonella* estão entre os principais patógenos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos e responsáveis por um número relevante de hospitalizações e mortes nos Estados Unidos.

Neste trabalho não houve a identificação dos metabólitos antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas, no entanto, sabe-se que esse efeito inibitório pode estar relacionado a produção de compostos bioativos como, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio ou bacteriocinas (OLOFSSON et al., 2016; PACHLA et al., 2018). A atividade antibacteriana das bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas tem sido relatada em diversos estudos (PLESSAS et al., 2012; FARAG et al., 2020; SINDI et al., 2020), sendo uma via alternativa ao uso de aditivos químicos por ser um bioconservante natural (SINDI et al., 2020).

Conseqüentemente, pesquisas adicionais com ênfase no isolamento e identificação dos compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas estudadas é requerido, uma vez que o tipo de bacteriocina depende de cada cepa. Em seu trabalho, Zendo et al. (2020) isolaram uma nova bacteriocina de *Apilactobacillus kunkeei* FF30-6 proveniente de *Apis mellifera*, com espectro antimicrobiano estreito, porém com alta atividade antimicrobiana contra patógenos de abelhas.

O efeito inibitório sobre bactérias patogênicas em humanos demonstra o potencial valor dessas bactérias, visando seu uso no tratamento de diversas infecções nas quais a utilização de antibióticos se encontra limitada. A emergência de bactérias multirresistentes é considerada um problema de saúde pública mundial onde estudos que visem a investigação de compostos antimicrobianos se torna promissor, porém ainda tem sido lento (VARELA et al., 2021).

Na pesquisa realizada por Rinita et al. (2021), as zonas de inibição produzidas por bactérias lácticas contra *S. aureus* (um importante patógeno causador de infecções de pele que tem demonstrado resistência a antibióticos utilizados na terapia humana) apresentaram o tamanho de 14,53 mm, ou seja, zonas de inibição menores do que os resultados da presente

pesquisa, demonstrando que as bactérias isoladas podem ter uma poderosa aplicação no tratamento de infecções de pele provocadas por este patógeno.

Além disso, essas bactérias podem ser utilizadas na meliponicultura como forma de prevenir doenças, melhorando a saúde e o desempenho das abelhas (TOOTIAIE, MOHARRAMI, MOJGANI, 2021). Isso pode ser verificado em pesquisas como as de Iorizzo et al., (2020) onde revelaram alta atividade inibitória de bactérias lácticas, isoladas do trato gastrointestinal das abelhas e produtos apícolas, contra importantes patógenos das abelhas *Ascospaera apis* e *Paenibacillus larvae*. Apesar de ser uma alternativa em relação ao antibiótico, o tratamento de colmeias utilizando bactérias probióticas ainda não tem sido explorado.

De acordo com a Tabela 1, quatro das 16 bactérias lácticas não apresentaram nenhum efeito inibitório sobre os micro-organismos indicadores, e por isso foram eliminadas e não deram continuidade nos testes posteriores. Dessa forma, as 12 melhores bactérias lácticas resultantes do teste anterior foram selecionadas e submetidas a análise de suscetibilidade antimicrobiana.

Maior resistência das bactérias lácticas foi observada para a vancomicina (58,33%), para os outros antimicrobianos (ampicilina, amoxicilina e cloranfenicol) todas as bactérias lácticas apresentaram sensibilidade (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e mel “verde” de *Melipona scutellaris*.

BACTÉRIAS LÁCTICAS	ANTIMICROBIANOS					
	GEN	AMP	TET	AMO	VAN	CLO
MI2	S	S	S	S	S	S
MI4	S	S	S	S	S	S
MI5	S	S	S	S	S	S
MI6	S	S	S	S	R	S
MV7	S	S	S	S	S	S
MV10	S	S	T	S	T	S
MI11	S	S	S	S	R	S
MI12	S	S	S	S	R	S
MI13	S	S	S	S	R	S
MI14	S	S	S	S	R	S
MI15	S	S	S	S	R	S

MI16 R S S S R S

M: *Melipona scutellaris*; I: trato gastrointestinal; V: mel verde

AMP: ampicilina (10 µg); AMOX: amoxicilina (10 µg); CLO: cloranfenicol (30 µg); GEN: gentamicina (10 µg); TET: tetraciclina (30 µg); VAN: vancomicina (30 µg)

R: resistente; T: intermediário; S: sensível.

A sensibilidade das bactérias lácticas aos antimicrobianos utilizados na terapia humana é um teste essencial quando se quer selecionar um micro-organismo probiótico, uma vez que, pode ocorrer transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos, das bactérias lácticas para micro-organismos patogênicos (ISPIRLI; DERTLI, 2021). Dessa forma, os resultados da sensibilidade das culturas lácticas aos antibióticos testados são importantes para sua futura aplicação como potenciais probióticos, pois atesta sua segurança no consumo.

No geral, das 12 bactérias lácticas testadas quanto à susceptibilidade antimicrobiana, apenas quatro não apresentaram nenhum tipo de resistência aos antimicrobianos e por isso foram selecionadas e avaliadas posteriormente com relação à tolerância às condições do trato gastrointestinal humano.

A sobrevivência no trato gastrintestinal precisa ser demonstrada para cada linhagem, pois é um pré-requisito para que a bactéria láctica exerça seu efeito benéfico. No geral as bactérias lácticas apresentaram crescimento nas condições simuladas (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do crescimento das bactérias lácticas isoladas do trato gastrointestinal e mel “verde” de *Melipona scutellaris* em pH 3 e diferentes concentrações de sais biliares.

Bactéria láctica	Tolerância ao pH 3	Tolerância aos sais biliares		
		0,05%	0,1%	0,5%
MI2	+	+	+	+
MI4	-	Não submetida	Não submetida	Não submetida
MI5	+	-	+	-
MV7	+	-	+	-

M: *Melipona scutellaris*; I: intestino; V: mel verde
Nenhum crescimento (-); crescimento (+)

A tolerância ao ácido é um dos critérios gerais que é considerado durante a seleção de cepas probióticas potenciais para garantir sua viabilidade e funcionalidade. Com relação ao

pH, apenas 25% das bactérias lácticas não apresentaram crescimento, representando um ótimo resultado. Em seu estudo, Ispirli e Dertli (2021) observaram 60% de inibição de crescimento das bactérias lácticas em pH 3, concluindo que a capacidade dessas bactérias em sobreviver a essa condição é específica para cada cepa. Os resultados estão de acordo com outras pesquisas, uma vez que cepas distintas de bactérias lácticas podem apresentar níveis distintos de sobrevivência em pH baixo (SAKANDAR; KUBOW; SADIQ, 2019; ELZEINI et al., 2021).

A tolerância aos sais biliares é outro pré-requisito para a colonização e atividade metabólica das bactérias lácticas no trato gastrointestinal do hospedeiro. Na presente pesquisa, todas as bactérias lácticas apresentaram tolerância para concentração de 0,1% de sais biliares, isso reflete uma adaptação das bactérias ao efeito do sal biliar. Em outro estudo foi observada inibição de 80% do crescimento das bactérias lácticas na concentração de 0,3% de sais biliares (ISPIRLI; DERTLI, 2021).

Por fim, as bactérias lácticas apresentaram diferentes tolerâncias nas condições simuladas do trato gastrointestinal, no entanto, a sua viabilidade pode ser melhorada utilizando técnicas como encapsulamento, que permite manter seu potencial probiótico (BARAJAS-ÁLVAREZ et al., 2021).

A identificação da bactéria também é um parâmetro que deve ser avaliado, uma vez que permite a coleta de informações de diversas características como a capacidade de produção de toxinas e fatores de virulência. Portanto, a identificação genética do micro-organismo é fundamental para avaliar sua segurança.

Nesta pesquisa as bactérias lácticas que apresentaram potencial probiótico foram devidamente identificadas, por meio da análise das sequências do RNA ribossomal 16S, como *Enterococcus faecium* (sendo que uma bactéria láctica foi isolada do “mel verde” e duas do trato gastrointestinal de *M. scutellaris*).

Muitos benefícios têm sido atribuídos ao uso de *E. faecium*, como sua contribuição para as características sensoriais dos queijos, propriedades probióticas e produção de substâncias antimicrobianas. No entanto, sua aplicação como probiótico deve ser cuidadosamente investigada, em virtude de algumas cepas serem consideradas patógenos oportunistas (OMER et al., 2021).

O conhecimento sobre fatores de virulência em *Enterococcus* com potencial aplicação como probiótico é de importância primária, pois podem conter caracteres de virulência

relacionados à patogenicidade. Além disso, seu potencial de virulência pode ser aumentado devido à resistência a antimicrobianos, como a vancomicina, e isso tem sido definido como a principal causa de infecções hospitalares (OMER et al., 2021). Nesse estudo todas as cepas apresentaram sensibilidade a este antimicrobiano assim como capacidade em produzir compostos inibidores contra patógenos potenciais.

Algumas cepas de *Enterococcus* são produtoras de enterocinas, bacteriocinas promissoras com potencial para uso na indústria de alimentos como bio-conservantes naturais contra patógenos de origem alimentar e cepas resistentes a drogas clinicamente significativas, como enterococos resistentes à vancomicina. Esses peptídeos antimicrobianos têm sido estudados particularmente devido à especificidade em seu modo de ação dependente das mutações ocorridas e da estabilidade frente às condições do ambiente, sendo esta uma vantagem para aplicação na indústria (FUGABAN et al., 2021).

Cepas de *E. faecium* isolados de queijo artesanal apresentaram suscetibilidade à vancomicina, atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923, e alta produção de exopolissacarídeo, além disso, foi analisado genes de virulência, onde os autores concluíram que a cepa *E. faecium* 894 mostrou ser um candidato potencial para mais investigações como cultura probiótica (ÖZKAN et al., 2021).

Em outro estudo foi avaliado o potencial probiótico de *E. faecium* CRL 183 comprovadamente seguro, sendo capaz de inibir em até 91,2% o fungo *Candida albicans* ATCC 90028. Os autores ainda concluíram que o probiótico desenvolvido em filmes solúveis é uma estratégia promissora na prevenção da candidíase oral, uma vez que permite a liberação local do probiótico (LORDELLO et al., 2021). Além disso, *E. faecium* mostrou ser a melhor cepa probiótica para resultados de atividade antioxidante, antidiabética e de fixação intestinal em ratos albinos diabéticos na pesquisa realizada por Rajput e Dubey (2020). Após o tratamento profilático usando uma mistura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB12 e *E. faecium* L3 foi observada uma redução nos sintomas e da necessidade de uso de medicamentos em crianças com rinite alérgica (ANANIA et al., 2021).

O uso de preparações probióticas contendo cepas de *E. faecium* em humanos demonstrou diminuir o colesterol sérico e incidência de infecções em bebês, além de aplicação na ração animal como estabilizadores da microbiota intestinal e agente redutor de patógenos intestinais em leitões, cães, gatos e galinhas (URSHEV; YUNGAREVA, 2020).

Além disso, a suplementação com *E. faecium* nas colmeias pode ser uma alternativa viável e eficaz para o fortalecimento das abelhas contribuindo consequentemente no aumento da produção de mel e por sua vez melhorando significativamente a resistência a infecções por patógenos nos meliponários.

Com base nesse histórico, não se descarta os potenciais efeitos benéficos desse micro-organismo, no entanto, mais estudos são recomendados para determinar sua segurança. Este é o primeiro relato no Brasil do isolamento e caracterização de bactérias lácticas probióticas em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* da região do Recôncavo da Bahia.

Conclusão

As bactérias lácticas isoladas nesse estudo e identificadas como *Enterococcus faecium* apresentaram um resultado promissor para que sejam usadas como potenciais probióticos. As cepas demonstraram sensibilidade aos antimicrobianos testados, capacidade em inibir bactérias patogênicas e tolerância as condições do trato gastrointestinal. No entanto, sua biossegurança deve ser avaliada com exatidão, por meio de análise de genes de virulência para seu uso seguro na indústria alimentícia e/ou farmacêutica.

Além disso, a identificação e o isolamento das substâncias inibidoras são uma avaliação necessária que pode ter grande impacto na área médica, uma vez que as cepas isoladas da região do Recôncavo da Bahia, apresentam características única desta área geográfica, podendo revelar novos antimicrobianos com importância no tratamento de difíceis infecções.

Tendo em vista os resultados dessa pesquisa e sabendo que não tem sido explorado o tratamento de colmeias utilizando bactérias probióticas, é encorajado mais testes que visem o fortalecimento das colônias das abelhas não apenas para uso econômico, mas principalmente pensando no papel essencial que esses animais realizam no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ADESULU-DAHUNSI, A.; SANI, A.; JEYARAM, K. Production, characterization and in vitro antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. **LWT – Food Science and Technology**, v. 87, p. 432-442, 2018.

AGUILAR-TOALA, Jose *et al.* Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 105-114, 2018.

AL-WAILI, Noori *et al.* The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. **Medical Science Monitor**, v. 11, p. 433-438, 2005.

AL-WAILI, Noori *et al.* Differences in Composition of Honey Samples and Their Impact on the Antimicrobial Activities against Drug Multiresistant Bacteria and Pathogenic Fungi. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 307-316, 2013.

AMINLARI, Ladan *et al.* Effect of Probiotics *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on Lipid Profile and Feces Bacteria of Rats Fed Cholesterol-Enriched Diet. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, p. 1163-1171, 2019.

ANANIA, Caterine *et al.* Treatment with a Probiotic Mixture Containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB12 e *Enterococcus faecium* L3 para a prevenção de sintomas de rinite alérgica em crianças: um ensaio clínico randomizado. **Nutrients**, v. 13, p. 1315, 2021.

AUDISIO, Carina *et al.* Properties of diferente lactic acid bactéria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. **Microbiological Research**, v. 166, p. 1-13, 2011.

AUDISIO, M.C.; SABATÉ, D.C.; BENÍTEZ-AHRENDTS, M.R. Effect of *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. **Beneficial Microbes**, v. 6, p. 687-695, 2015.

ARGYRI, Anthoula *et al.* Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Food Microbiology**, v. 33, p. 282-291, 2013.

ARREDONDO, Daniela *et al.* *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. **Beneficial Microbes**, v. 9, p. 279-290, 2018.

AWEEN, Mohamed *et al.* Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) Gram-positive bacteria. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 364-371, 2012.

BARAJAS-ÁLVAREZ, P.; MARISELA G.A.; HUGO E.A. Recent Advances in Probiotic Encapsulation to Improve Viability under Storage and Gastrointestinal Conditions and Their Impact on Functional Food Formulation. **Food Reviews International**, v.1, p. 1-9, 2021.

BARBOSA, Flávio *et al.* Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 11, p. 11-21, 2011.

CASAROTTI, Sabrina *et al.* Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. **Food Research International**, v. 59, p. 67-75, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). (2018). **Listeria Outbreaks**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html/>. Acesso em: 20 maio 2019.

CHEN, Chen *et al.* Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, p. 316-330, 2017.

CHIODA, Tammy. *et al.* Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 583-585, 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). (2012). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement**. 31, 1- 186, Disponível em: file:///C:/Users/Nay/Downloads/previews_CLSI_M02A11E_M100S22E_pre.pdf. Acesso em: 20 maio 2017.

COEURET, Valérie *et al.* Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. **Lait**, v. 83, p. 269-306, 2003.

DEEGAN, Lucy *et al.* Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 1058-1071, 2006.

DOMINGOS-LOPES, Marina *et al.* Immunomodulatory activity of exopolysaccharide producing *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pico cheese. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 235-243, 2017.

EL-MABROK, Asma *et al.* Screening of lactic acid bacteria as biocontrol against (*Colletotrichum capsici*) on chilli bangi. **Research Journal of Applied Sciences**, v. 7, p. 466-473, 2012.

ELZEINI, Hoda *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, p. 1-9, 2020.

ELZEINI, Hoda *et al.* Probiotic capacity of new lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of worker bees. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, p. 1-9, 2021.

ELLEGAARD, Kirten *et al.* Vast Differences in Strain-Level Diversity in the Gut Microbiota of Two Closely Related Honey Bee Species **Current Biology**, v. 30, p. 1-12, 2020.

ENDO, A.; SALMINEN, S. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, p. 444-448, 2013.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 97-300, 2000.

EVIVIE Smith *et al.* Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. **Food & Nutrition Research**, v. 61, p. 1318034, 2017.

- FARAG, Mohamed *et al.* The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavor Chemistry, Nutritional Value, Health and Safety Benefits. **Nutrients**, v. 12, p. 346, 2020.
- FAZILAH, Nurul *et al.* Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387-399, 2018.
- FILIPPIS, F.; PASOLLI, E.; ERCOLINI, D. The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, p. 454-489, 2020.
- FIORDA, Fernanda *et al.* Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.
- FONTANA, Luis *et al.* Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 35-50, 2013.
- FUGABAN, Joanna *et al.* Characterization of partially purified bacteria produced by *Enterococcus faecium* strains isolated from soybean paste active against *Listeria* spp. and vancomycin-resistant Enterococci. **Microorganisms**, v. 9, p. 1085, 2021.
- FÜNFHAUS, A.; EBELING, J.; GENERSCH, E. Bacterial pathogens of bees. **Current Opinon Insect Science**, v. 26, p. 89-96. 2018.
- GIRAFFA, Giorgio. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 391-398, 2012.
- HMOOD, K.A.; HABEEB, A.H.; AL-MHNNA, K.I. Antioxidant role of *Lactobacillus* sp isolated from honey bee against histological effects of Ochratoxin in vivo. **Journal of Biology**, v. 11, p. 67-80, 2019.
- IORIZZO, Massimo *et al.* Antagonistic Activity Against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. **Antibiotics**, v. 9, p. 262, 2020a.
- IORIZZO, Massimo *et al.* Antimicrobial activity against *Paenibacillus larvae* and functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: potential health benefits for bees. **Antibiotics**, v. 9, p. 442, 2020b.
- ISPIRLI, H.; ENES, D. Detection of fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) in bee bread and bee pollen samples and determination of their functional roles. **Food Processing and Preservation**, v. 45, p. 1-15, 2021.
- JANASHIA, Irakli *et al.* Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. **Annals of Agrarian Science**, v. 14, p. 177-181, 2016.

JANASHIA, I.; ALAUX, C. Specific immune stimulation by endogenous bacteria in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, p. 1474-1477, 2016.

JING, T.; QI, F.; WANG, Z. Most dominant roles of insect gut bacteria: Digestion, detoxification or essential nutrients provision? **Microbiome**, v. 8, p. 2-20, 2020.

KORCZ, E.; KERÉNYI, Z.; VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: Potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Functional Journal**, v. 9, p. 3057-3068, 2018.

KWONG, W.K.; MANCENIDO, A.L.; MORAN, N.A. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. **Royal Society Open Science**, v. 4, p. 170003, 2017.

LEE C.S.; KIM S.H. Anti-inflammatory and anti-osteoporotic potential of *Lactobacillus plantarum* A41 and *L. fermentum* SRK414 as probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 623-634, 2020.

LERTWORAPREECHA, L.; POONSUK, K.; CHALERMCHIAKIT, T. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the in vitro properties. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 33, p. 9-14, 2011.

LONDON, Lis *et al.* Exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacilli* reduce serum cholesterol and modify enteric microbiota in ApoE-deficient mice. **Journal of Nutrition**, v. 144, p. 1956-1962, 2014.

LORDELLO, Virginia *et al.* The orodispersible film loaded with *Enterococcus faecium* CRL183 shows anti-*Candida albicans* biofilm activity *in vitro*. **Pharmaceutics**, v.13, p. 998, 2021.

MALDONADO, Natalia *et al.* Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. **Livestock Science**, v. 212, p. 99-110, 2018.

MALLAPPA, Rashmi *et al.* Screening and selection of probiotic *Lactobacillus* strains of Indian gut origin based on assessment of desired probiotic attributes combined with principal component and heatmap analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 105, p. 272-281, 2019.

MATO, Inés *et al.* Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 54, p. 1541-1550, 2006.

MCFREDERICK, Q.S.; VUONG, H.Q.; ROTHMAN, J.A. *Lactobacillus micheneri* sp. nov., *Lactobacillus timberlakei* sp. nov. and *Lactobacillus quenuiae* sp. nov., lactic acid bacteria

isolated from wild bees and flowers. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1879-1884, 2018.

MUÑOZ-QUEZADA, Sergio *et al.* Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 51-62, 2013.

NOWAK, I.; NOWAK, A.; LESKA, A. American foulbrood, as an infectious disease of honey bees-Selected legal and environmental aspects. **Studies in Law and Economics**, v. 115, p. 87-108, 2020.

OAK, S.J.; JHA, R. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 1675-1683, 2018.

OLOFSSON, Tobias. *et al.* A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies; *Apis mellifera* (Buckfast), *A. m. scutellata*, *A. m. mellifera*, and *A. m. monticola*. **Apidologie**, v. 42, p. 1-4, 2011.

OLOFSSON, Tobias *et al.* Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. **International Wound Journal**, v. 13, p. 668-679, 2014.

OLOFSSON, Tobias *et al.* **Lactic acid bacterial symbionts in honeybees - an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. International Wound Journal**, v. 13, p. 668-679, 2016.

OMER, Celik *et al.* Isolation and identification of lactobacilli from traditional yogurts as potential starter cultures. **LWT Food Science and Technology**, v. 148, p. 1-9, 2021.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções para ação**. 2012. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf (2012). Acesso em: 20 abr. 2019.

ÖZKAN, E.R; TALHA D.; NIHAT, A. *In vitro* assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. **LWT Food Science and Technology**, v. 141, p. 1-10, 2021.

PACHLA, Artur *et al.* The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of *Apis mellifera* L. derived from a Polish apiary. **Journal of Applied Genetics**, v. 59, p. 503-514, 2018.

PATTABHIRAMAIAH, M.; REDDY, M.S.; BRUECKNER, D. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, p. 1135-1146, 2012.

- PEGHAIRE, Elodie *et al.* A *Pediococcus* strain to rescue honeybees by decreasing *Nosema ceranae*-and pesticide-induced adverse effects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 138-146, 2020.
- PENNACCHIA, Carmelina *et al.* Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.
- PEREIRA, Gilberto *et al.* How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 2060-2076, 2018.
- PETROVA, P.; PETROV, K. Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 25, p. 114-116, 2011.
- PLESSAS, Stavros *et al.* Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. **Fermentation**, v. 3, p. 1, 2017.
- PRADO, Flávera *et al.* Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 489-497, 2015.
- RABIUL, Islam *et al.* Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria and Extraction of Bacteriocin Protein. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 11, p. 49-59, 2020.
- RAJPUT, K.; RAMESH, C.D. *In vitro* antioxidant and *in vivo* antidiabetic activity of two potential probiotic *Enterococcus* spp. on alloxan-induced diabetic rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 14, p. 94-98, 2021.
- RENGPIPAT, S.; RUEANGRUKLIKHIT, T.; PIYATIRATITIVORAKUL S. Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 134-143, 2008.
- RINITA, Amelia *et al.* Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Found in Dadiah on Disease-Causing Skin Infections. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, v. 15, p. 1-9, 2021.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.
- ROKOP, Z.P.; HORTON, M.A.; NEWTON, I.L.G. Interactions between cooccurring lactic acid bacteria in honey bee hives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 7261-7270, 2015.
- RYAN, M. *et al.* An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 612-619, 1996.

SAADAT, Y.R.; KHOSROUSHAHIB, A.Y.; GARGARI, B.P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 79-89, 2019.

SABER, Amir *et al.* Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 96-115, 2017.

SAKANDAR, H. A.; KUBOW, S.; SADIQ, F. A. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. **LWT Food Science and Technology**, v. 104, p. 70-75, 2019.

SHOKRYAZDAN, Parisa *et al.* Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-16, 2014.

SIDDIQEE, M.H.; SARKER, H.; SHUROVI, K.M. Assessment of probiotic application of lactic acid bacteria (LAB) isolated from different food items. **Stamford Journal of Microbiology**, v. 2, p. 10-14, 2012.

SINDI, Abrar *et al.* Antimicrobial Activity of Six International Artisanal Kefirs against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella entérica* Serovar Enteritidis, and *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, v 8, p. 849, 2020.

SORNPLANG, P; PIYADEATSOONTORN, S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. **Journal of Animal Science Technology**, v. 58, p. 26, 2016.

TAJABADI, Naser *et al.* Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. **Apidologie**, v. 42, p. 642- 649, 2011.

TAJABADI, Naser *et al.* Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 717-722, 2013.

TALLAPRAGADA, Padmavathi *et al.* Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p 357-362, 2018.

TOOTIAIE S.; MOHARRAMI M.; MOJGANI N. Honeybee Gut: Reservoir of Probiotic Bacteria. In: MOJGANI, N.; DADAR, M. (eds) **Probiotic Bacteria and Postbiotic Metabolites: Role in Animal and Human Health**. Microorganisms for Sustainability, vol 2. Singapura: Springer, 2021.

URSHEV, Z.; TSVETELINA, Y. Initial safety evaluation of *Enterococcus faecium* LBB.E81. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, p. 11-17, 2021.

VAHEDI-SHAHANDASHTI, Roya *et al.* Antagonistic activities of some probiotic lactobacilli culture supernatant on *Serratia marcescens* swarming motility and antibiotic resistance. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 9, p. 348-355, 2017.

VARELA, Manuel *et al.* Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **Antibiotics**, v. 10, p. 593, 2021.

VÁSQUEZ, Alejandra *et al.* Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. **PLoS One**, v. 7, p. 1-9, 2012.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895-904, 2003.

WU, Meihua *et al.* Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. **Journal of Insect Science**, v. 14, p. 129. 2014.

YU, Zhihui *et al.* Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 489-498, 2013.

ZENDO, Takeshi *et al.* Kunkecin A, a New Nisin Variant Bacteriocin Produced by the Fructophilic Lactic Acid Bacterium, *Apilactobacillus kunkeei* FF30-6 Isolated From Honey Bees. **Frontiers Microbiology**, v. 11, p. 571903, 2020.

ZHENG, Hao *et al.* Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. **Proceedings of National Academy Sciences**, v. 114, p. 4775-4780, 2017.

ZOMMITI, M.; CHIKINDAS, M.L.; FERCHICH, M. Probiotics-Live Biotherapeutics: a Story of Success, Limitations, and Future Prospects—Not Only for Humans. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 1266-1289, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias lácticas isoladas demonstraram serem potenciais produtoras de metabólitos antimicrobianos eficientes contra diferentes cepas patogênicas. Essas descobertas promissoras podem ser benéficas para a conquista de novos conservantes na indústria de alimentos e possível substituição de drogas antibióticas usadas no tratamento de infecções.

A infecção por patógenos está entre uma das principais causas para o declínio das abelhas, assim a suplementação das abelhas com bactérias lácticas probióticas é uma estratégia promissora para melhorar a saúde e o desempenho das colmeias, sendo também uma alternativa viável ao uso de antibióticos para fortalecer as colônias e não deixá-las suscetíveis a infecções.

Nossos estudos futuros estarão focados na identificação dos metabólitos responsáveis por essas interações antagônicas. Além disso, serão realizados mais testes (capacidade de hemólise, genes de virulência) para confirmar a segurança de cada cepa e benefícios.

Estudos são necessários para avaliar o potencial *in vivo* das bactérias lácticas isoladas para futura aplicação como suplementos para alimentação e tratamento de humanos e animais.

ANEXO A – Níveis de suscetibilidade de bactérias lácticas a antimicrobianos de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm).

Antimicrobianos	Padrão interpretativo (zonas de inibição em mm)*	
	Resistente	Suscetível
Amoxicilina+ácido clavulânico	<19	>20
Ampicilina	<19	>20
Bacitracina	<08	>13
Cefalexina	<14	>18
Cefalotina	<14	>18
Ciprofloxacina	<15	>21
Clorafenicol	<12	>18
Eritromicina	<13	>18
Estreptomicina	<11	>15
Gentamicina	<12	>15
Imipenem	<13	>16
Kanamicina	<13	>18
Neomicina	<12	>17
Norfloxacina	<12	>17
Oxacilina	<09	>14
Penicilina G.	<20	>29
Rifampicina	<24	>25
Sulfonamida	<12	>17
Tetraciclina	<14	>19
Vancomicina	<09	>12

*LARBOCLIN, 2003.