

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS
DEL INTESTINO DE *APIS MELLIFERA* L. COLECTADAS EN EL SUR DE
CHILE**

POR

CATALINA JESÚS LAZCANI TORRES

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN - CHILE
2019**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS
DEL INTESTINO DE *APIS MELLIFERA* L. COLECTADAS EN EL SUR DE
CHILE**

POR

CATALINA JESÚS LAZCANI TORRES

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN - CHILE
2019**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.
Ing. Agrónomo, Dr.

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Profesor, Nolberto Arismendi S.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FIA, PYT 2017 - 0241, de nombre: "Desarrollo de un bioestimulante probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *A. mellifera* frente a los patógenos DWV y *Nosema ceranae* y su adaptación al cambio climático".

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	1
Introducción.....	2
Materiales y Métodos.....	5
Resultados y Discusión.....	9
Conclusiones.....	15
Referencias.....	15

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Prevalencia de géneros de bacterias lácticas identificadas en el intestino de <i>A. mellifera</i> del sur de Chile (n=183).....	9
Figura 2 Prevalencia de géneros de bacterias lácticas identificadas en el intestino de <i>A. mellifera</i> de la Región de Los Ríos y de los Lagos, analizadas según el total de cada región (n=154).....	10
Figura 3 Cladograma de las relaciones genéticas entre aislados bacterianos de <i>Lactobacillus kunkeei</i> de la Región de Los Lagos, de acuerdo al producto de BOX-PCR con el partidor BOXA1R.....	13
Figura 4 Cladograma de las relaciones genéticas entre aislados bacterianos de <i>Bifidobacterium asteroides</i> , de acuerdo al producto de BOX-PCR con el partidor BOXA1R.....	14
Tabla 1 Partidores específicos utilizados para identificación de especies de bacterias lácticas.....	7
Tabla 2 Prevalencia de especies de bacterias lácticas en el intestino de <i>A. mellifera</i> del sur de Chile, analizados por región.....	11

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DEL INTESTINO DE *APIS MELLIFERA* L. COLECTADAS EN EL SUR DE CHILE

MOLECULAR CHARACTERIZATION LACTIC BACTERIA ISOLATED FROM THE INTESTINE OF *APIS MELLIFERA* L. COLLECTED IN THE SOUTH OF CHILE

Palabras índice adicionales: abejas melíferas, lactobacterias, *Lactobacillus kunkeei*, *Bifidobacterium asteroides*.

RESUMEN

La disminución de colonias y muerte de *Apis mellifera* L. a nivel mundial, es un tema preocupante, ya que las abejas melíferas son consideradas como unos de los insectos más importantes para la humanidad y el ecosistema, debido a su rol fundamental en la polinización. A esta desaparición repentina de abejas obreras, se le denomina síndrome del colapso de la colmena (CCD). Aunque no existe una causa única, se han relacionado diferentes factores, como el uso de pesticidas y las infecciones de diversos patógenos. Diferentes estudios han determinado que la microbiota bacteriana intestinal benéfica tiene directa relación con la salud general de *A. mellifera* y su colonia. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar molecularmente especies de bacterias lácticas presentes en el intestino de abejas melíferas colectadas en el sur de Chile. Mediante PCR con partidores específicos y secuenciación se demostró que la bacteria láctica más predominante en abejas colectadas en la Región de los Ríos fue *Lactobacillus kunkeei* (81,9 %) y en la Región de los Lagos fue *Bifidobacterium asteroides* (53,7 %). A través de la huella genética, se determinó una amplia diversidad genética entre cepas de las especies anteriormente nombradas. Además, se identificaron otras bacterias lácticas presentes en el intestino de las abejas, como: *Weissella bombi*, *Lactobacillus helsingbongensis*, *Lactobacillus panisapium* y *Lactococcus lactis*.

SUMMARY

The decrease of colonies and death of *Apis mellifera* L. worldwide, is a worrying

issue, since honey bees are considered as one of the most important insects for humankind and the ecosystem, due to their fundamental role in pollination. This sudden disappearance of worker bees is called the Colony Collapse Disorder (CCD). Although there is no single cause, different factors have been related to it, such as the use of pesticides and infections of various pathogens. Different studies have determined that the beneficial intestinal bacterial microbiota is directly related to the general health of *A. mellifera* and its colony. The objective of this study was to molecularly characterize species of lactic bacteria present in the intestine of honey bees collected in southern Chile. Using PCR with specific primers and sequencing, it was shown that the lactic bacteria most prevalent in bees collected in Los Ríos Region was *Lactobacillus kunkeei* (81.9 %) and in Los Lagos Region was *Bifidobacterium asteroides* (53.7 %). Through the genetic fingerprint, a wide genetic diversity was determined between strains of the previously named species. In addition, other lactic bacteria present in the bees' intestines were identified, such as: *Weissella bombi*, *Lactobacillus helsingborgensis*, *Lactobacillus panisapium* and *Lactococcus lactis*.

INTRODUCCIÓN

Apis mellifera L., es la abeja melífera más común, pertenece al orden de insectos Hymenóptera que incluye miles de especies de abejas, avispa, abejorros, hormigas y otras especies. Es nativa de la zona tropical de África y ha sido globalmente distribuida debido a su buen hábito de pecoreo, fácil manejo y su servicio como insecto polinizador en su hábitat. Sin embargo, también son esenciales para la producción de numerosos cultivos en sistemas agrícolas, además de la producción de miel y extracción de productos y subproductos melíferos (Calderone, 2012; Spivak *et al.*, 2011; Morse y Calderone, 2000). Debido a su rol de insecto polinizador y su relevante papel ecológico, se le ha considerado de gran importancia para la humanidad (Gallai *et al.*, 2009).

La polinización es un proceso importante para la reproducción sexual de la mayoría de las plantas para dar origen a frutos y semillas (Aguilar *et al.*, 2006). Alrededor del 80 % de la polinización se realiza por las abejas melíferas y el porcentaje restante se poliniza a través del viento y otros himenópteros,

especialmente abejorros (Alins, 1980). Se ha estimado que 70 de los 107 cultivos más importantes para la dieta humana son estrictamente dependientes de la polinización animal, siendo las abejas las especies económicamente más valiosas (Klein *et al.*, 2007). Recientes estudios revelan la disminución de insectos polinizadores en el mundo, principalmente de las abejas melíferas y de abejorros (Gallai *et al.*, 2009; Verde, 2011). En efecto, durante los últimos años se han observado pérdidas inexplicables de colonias de *A. mellifera* en los Estados Unidos, cuyos apicultores perdieron aproximadamente el 30 % de sus colonias en la temporada 2010 - 2011 (VanEngelsdorp *et al.*, 2012). A esta manifestación se le denominó síndrome del colapso de la colonia (CCD) ya que el principal rasgo fue la desaparición repentina de las abejas obreras adultas (VanEngelsdorp *et al.*, 2009). Esta rápida disminución de las poblaciones mundiales de abejas melíferas podría tener efectos significativos para los sistemas ecológicos, la economía y la seguridad alimentaria (Klein *et al.*, 2007).

En Chile, la actividad apícola se desarrolla en todo el país, excepto en las regiones más australes (Velis *et al.*, 2009), y aun cuando no se ha descrito el CCD, si se han observado eventos de muerte masiva de abejas en algunas regiones del país (Rodríguez *et al.*, 2012).

Aunque aún no se ha identificado una causa única del colapso de las abejas melíferas, se ha demostrado que los pesticidas y los patógenos tienen un efecto subletal (Klein *et al.*, 2007) y se ha sugerido que existe una interacción entre agentes patógenos y otros factores de estrés que estarían involucrados en este síndrome tales como la pérdida y fragmentación de hábitat, el uso de agroquímicos, la introducción de especies exóticas y el cambio climático (VanEngelsdorp *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2010), lo cual conlleva un aumento en el interés por estudiar las relaciones entre las abejas y sus patógenos (Araneda *et al.*, 2015).

Las abejas melíferas son afectadas por diversos patógenos, lo cual incluye enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y ectoparásitos (Higes *et al.* 2008; Klein *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2015). Pero al igual que todos los animales, estas poseen defensas mecánicas, fisiológicas e inmunológicas contra

los agentes patógenos (Schmid *et al.*, 2008; Evans y Spivak, 2010; Schwarz *et al.*, 2015). Las barreras mecánicas incluyen la cutícula y las capas epiteliales del insecto, que evitan que los patógenos se adhieran o entren al cuerpo, las defensas fisiológicas incluyen cambios de pH y otras condiciones químicas del intestino del insecto, mientras que las inmunológicas incluyen proteínas que reconocen los parásitos, proteínas que actúan en respuesta a los estímulos (Evans y Spivak, 2010). Sin embargo, estos mecanismos a menudo no son suficientes para superar las infecciones por patógenos y parásitos, por lo que los apicultores con frecuencia aplican diferentes productos antibióticos o acaricidas para prevenir o controlarlas (Schwarz *et al.*, 2015). Sin embargo, estos pueden causar un desequilibrio en la flora intestinal, afectando el metabolismo de las abejas y su respuesta inmune (Evans y Spivak, 2010).

Apis mellifera presenta una amplia gama de microbiota intestinal bacteriana que participan en procesos de digestión, nutrición, inmunidad y puede tener directa relación con la salud general de las abejas y su colonia, pero se conoce poco sobre la biología de los simbioses intestinales (Engel *et al.*, 2013). En particular, se han identificado lactobacterias (bacterias productoras de ácido láctico, BAL) presentes en el intestino de las abejas (Audisio *et al.*, 2011), con capacidad antimicrobial y estimuladoras del sistema inmune, que previenen o reducen considerablemente las infecciones por patógenos (Olofsson y Vásquez, 2008; Forsgren *et al.*, 2010). Con relación a estas características, las BAL son recientemente evaluadas como agentes probióticos en *A. mellifera* (Arredondo *et al.*, 2018; Corby-Harris *et al.*, 2014; Evans y Spivak, 2010). Se han realizado múltiples intentos para identificar y caracterizar las bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal que se pueden utilizar como probióticos (Alberoni *et al.*, 2016).

Las abejas y las bacterias formadoras de ácido láctico han evolucionado en mutua dependencia, dejando a las abejas y a su miel protegidas de los microorganismos no deseados (Vásquez *et al.*, 2009). Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se consideran especies bacterianas favorables, son comúnmente encontradas en individuos sanos y confieren beneficios para la salud en el

hospedero (Olofsson y Vásquez, 2008). Por ejemplo, estudios han demostrado que la administración de diferentes especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en larvas infectadas con Loque americano (*Paenibacillus larvae*), han reducido significativamente la mortalidad por esta bacteria (Forsgren *et al.*, 2010), y en investigaciones más recientes, la aplicación de *Lactobacillus kunkeei* como probiótico, ha demostrado una reducción en la carga de *Nosema ceranae* de abejas melíferas adultas (Arredondo *et al.*, 2018) y esta misma especie resultó ser la más eficiente controlando el loque europeo (*Melissococcus plutonius*) (Endo y Salminen, 2013).

Dado los antecedentes presentados, el objetivo de esta investigación fue, caracterizar molecularmente especies de bacterias lácticas aisladas del intestino de abejas colectadas en el sur de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antecedentes generales

La investigación se realizó en el laboratorio de Virología y Sanidad Apícola del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Chile.

Colecta de abejas

La colecta de abejas se realizó en abril del 2017, en 15 apiarios ubicados en el sur de Chile, 8 apicultores de la Región de los Ríos y 7 de la Región de los Lagos, donde se muestrearon 3 colmenas de cada apicultor seleccionadas al azar. Se colectaron al menos 50 abejas pecoreadoras por colmena, las cuales se dispusieron en envases con ventilación y fueron trasladadas al laboratorio de Virología de la Universidad de Concepción.

Aislación y selección de colonias bacterianas

A 50 abejas de cada muestra se le extrajeron los intestinos y se maceraron en morteros estériles agregando 2 mL de PBS. Luego se realizaron diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , y una alícuota fue sembrada por arrastre, es decir, distribuida homogéneamente en la superficie del medio MRS con CaCO_3 (1 %) (medio semiselectivos para *Lactobacillus*) y en medio MRS con L-cisteína (0,05 %) (medio

semiselectivo para *Bifidobacterium*), utilizando una pipeta Pasteur adaptada como rastrillo. Las placas se dispusieron en cámara de anaerobiosis y se dejaron incubando por 48 h a 30 °C.

En el medio MRS con CaCO_3 se seleccionaron todas las colonias que formaron el halo característico para las lactobacterias y en el medio MRS con L-cisteína se tomaron las colonias bacterianas que poseían diferentes características morfológicas, como tamaño, forma, color y desarrollo de la colonia. Las colonias seleccionadas fueron sembradas en cuadrantes en sus respectivos medios y se colocaron en la cámara de incubación por al menos 48 h a 30 °C (en condición aeróbica). Transcurrido este tiempo se tomó cada colonia pura y se sembró en caldo MRS con CaCO_3 o caldo MRS con L-cisteína según corresponda, dejándose en agitación por 48 h a 30 °C. Luego se tomó una alícuota para ser criopreservada en glicerol al 80 %.

Las bacterias criopreservadas fueron activadas en medio MRS y se les realizó la prueba gram y actividad catalasa. Se seleccionaron aquellas bacterias gram positivas y catalasa negativas (Olofsson y Vásquez, 2008).

Preparación de células para PCR

Los cultivos puros obtenidos en la etapa de aislamiento y selección, dispuestos en tubos Eppendorf de 1,5 mL, fueron lavados en agua ultrapura y centrifugado (10 min a 3.000 rpm) 2 veces y el último precipitado fue resuspendido en 30 μL de agua ultrapura. Las células se sometieron a un shock de temperatura, primero se pusieron a -80 °C por 10 min y rápidamente se llevó a 99 °C.

Identificación de cepas bacterianas

Con las células obtenidas del procedimiento anterior se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction). Tomando en cuenta que las bacterias más frecuentes en el intestino de las abejas son *Lactobacillus kunkeei* y *Bifidobacterium asteroides* (Tajabadi *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2009), se emplearon partidores específicos (Arismendi, sin publicar), para determinar si las colonias aisladas pertenecen a estas especies.

Las PCR con partidores específicos fueron llevadas a cabo en un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyclor, Labnet International Inc.,

Woodbridge, NJ, USA. Para esto, se preparó en tubos PCR una mezcla que contenía 2 μ L de preparado celular, 2,5 μ L de solución tampón (10x), 1,0 μ L de Cloruro de magnesio ($MgCl_2$, 50 mM), 0,2 μ L de *Taq* Polimerasa (5U/ μ L; InvotrogenTM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1,0 μ L de Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, 2,5 mM), 17,5 μ L de agua ultrapura y por último 0,5 μ L de cada partidor específico (10 μ M) para cada especie (Arismendi, sin publicar) (Tabla 1).

Tabla 1. Partidores específicos utilizados para identificación de especies de bacterias lácticas.

Partidores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Especies
LactKun3F	GAGGAAGTGCAGTGGAACTACA	222	<i>Lactobacillus kunkeei</i>
LactKun3R	CGGAAACCCTCCAACACCTAGTAT	222	<i>Lactobacillus kunkeei</i>
Bast-F	AAGCTTGCTTGCTTGGCGGTGAGA	151	<i>Bifidobacterium asteroides</i>
Bast-R	CATCCCATGCCGGTAAACCCTTTC	151	<i>Bifidobacterium asteroides</i>

Las amplificaciones se llevaron a cabo realizando una desnaturalización inicial a 95 °C durante 7 min, seguido de 1 min a 94 °C, continuando con el alineamiento de los partidores a 52 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 8 minutos y una elongación final a 72 °C por 16 min.

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) con 0,04 μ L/mL de tinción de ácido nucleico Gel RedTM (Biotium Inc., Hayward, CA, EE.UU.) en un tampón TAE a 80 V durante 45 min. Los amplicones se observaron y fotografiaron en un transiluminador de luz UV.

Para aquellas muestras en las cuales se observó una banda del tamaño esperado y que fueron identificadas como pertenecientes a alguna de las especies mencionadas, se les hizo pruebas de huella genética mediante el BOX PCR. En aquellas muestras en las que no se observó un amplicón se realizó una PCR con partidores universales FD1 5'-AGA GTT TGA TCC TGG -3' y RP2 5'- ACG GCT ACC TTG TTA -3' (Weisburg *et al.* 1991) mediante análisis del gen ribosomal

ARNr 16S y se enviaron a secuenciar a la empresa de secuenciación MacroGen Inc, Korea. Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron ensamblados y corregido con el programa Chromas, luego fueron comparadas e identificadas con la base de datos en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Diversidad genética

Para identificar los aislados a nivel de cepa se utilizó la técnica molecular de BOX PCR usando el partidor BOX A1R 5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3' (Versalovic *et al.*, 1994) como partidor de acuerdo con la metodología utilizada por Guiñazú *et al.* (2013).

La mezcla de reactivos para PCR para un volumen final de 25 μ L se preparó en tubos PCR con 2 μ L de preparado celular, 2,5 μ L de solución tampón (10x), 1,0 μ L de Cloruro de magnesio ($MgCl_2$, 50 mM), 0,3 μ L de *Taq* Polimerasa (1U), 2,0 μ L de Desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTPs, 2,5 mM), 12,2 μ L de agua ultrapura, 5,0 μ L de Box A1R.

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando una desnaturalización inicial a 95 °C durante 7 min, seguido de 1 min a 94 °C, el alineamiento del partidor a 52 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 8 min y una elongación final a 72 °C por 16 min.

Los productos obtenidos de la PCR se analizaron por electroforesis. Se prepararon 100 mL de gel de agarosa al 2 % (p/v) en una solución tampón TAE (1X) con 6,0 μ L de SYBR Safe DNA gel stain 10000X, que se solidificó en un molde para electroforesis. En cada celdilla se depositaron 3 μ L de buffer de carga (Blue Juice (10X)) y 20 μ L de cada muestra resultado de la PCR, dejando libre un espacio al inicio y otro al final de las muestras para poner 5 μ L de marcador de peso en cada uno. La electroforesis se desarrolló a una potencia de 70 V y a 54 mA por 3 ½ h. La visualización de las bandas se hizo mediante un transiluminador UV conectado a una cámara digital. Para identificar cepas únicas y descartar copias idénticas, se analizó los patrones de bandas obtenidos y se construyó una matriz binaria indicando ausencia o presencia de bandas a cada tamaño de fragmento usando el software AFLP-SURV (Vekemans, 2002), luego se analizó la

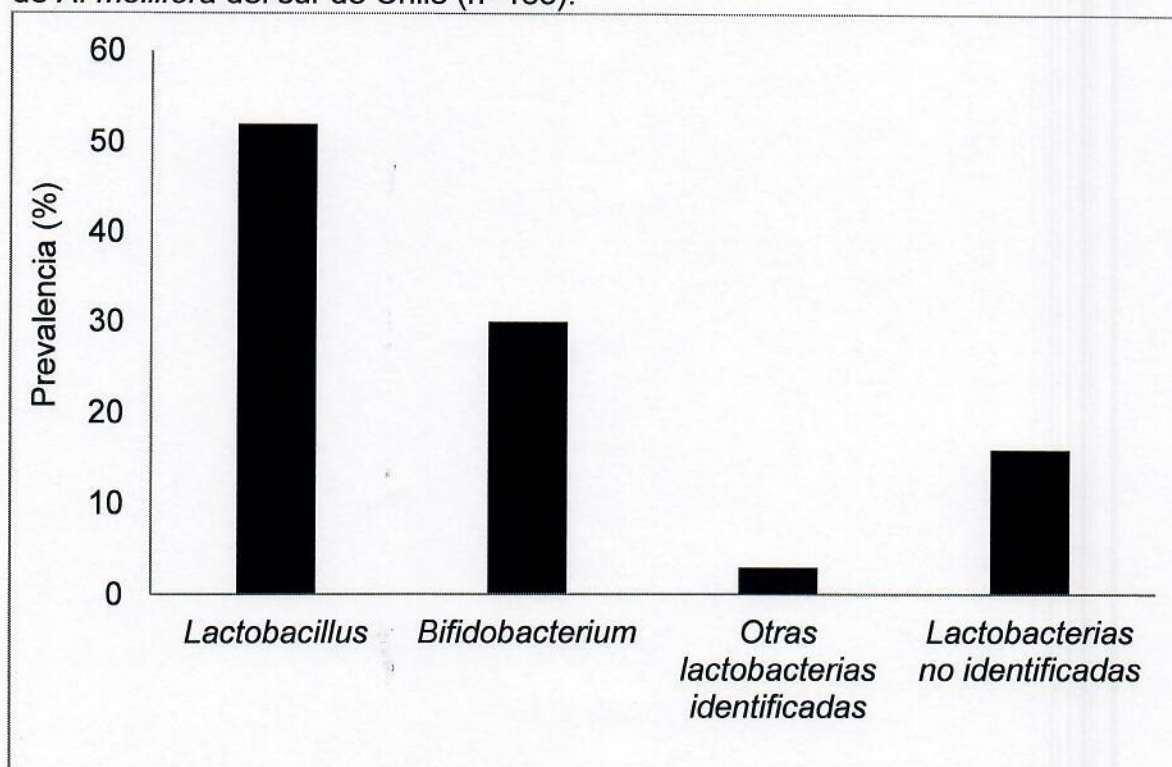
distancia genética utilizando el método del vecino más cercano en el software PHYLIP (the Phylogeny Inference Package) el cual es un paquete de programas para inferir filogenias (Felsenstein, 2014), finalmente se utilizó el programa MEGA 5.2. para la construcción de los cladogramas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y selección de colonias bacterianas

Se aislaron 255 bacterias desde el intestino de abejas colectadas en el sur de Chile, 151 bacterias de la Región de Los Ríos y 104 de la Región de Los Lagos. De las 255 bacterias aisladas, 183 cumplieron con las características de ser gram positiva y catalasa negativa. Estas características determinan que fueron bacterias productoras de ácido láctico (Olofsson y Vásquez, 2008). Mediante las PCR con partidores específicos se determinó que los géneros más prevalentes entre las 183 bacterias fueron *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Figura 1).

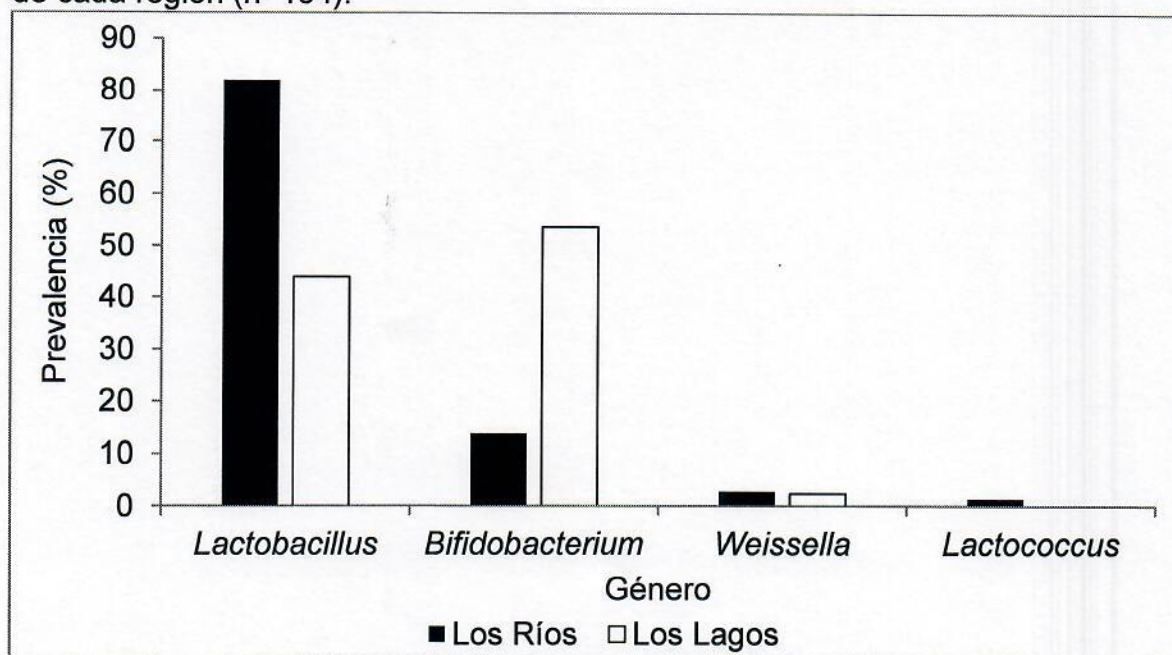
Figura 1. Prevalencia de géneros de bacterias lácticas identificadas en el intestino de *A. mellifera* del sur de Chile (n=183).



Los géneros de las bacterias encontradas en el intestino de abejas del sur de Chile concuerdan con los resultados de estudios realizados por diferentes autores (Moran *et al.*, 2012; Olofsson and Vásquez, 2008; Tajabadi *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2009). Se determinó que *Lactobacillus* es el género más predominante en los intestinos de las abejas analizadas ($n=95/183$) (Figura 1). Esto coincide con los estudios de Moran (2012), que ha estimado que *Lactobacillus* es el grupo más abundante en el intestino de la abeja y que alcanza entre un 20 a 99 % del total de las bacterias en el intestino de abejas obreras. *Bifidobacterium* fue el segundo género en mayor abundancia, los resultados muestran que este género corresponde al 29,5 % ($n=54/183$) del total de las lactobacterias analizadas en abejas del sur de Chile. Sin embargo, Moran (2012) ha estimado que comprende hasta el 15 % de las bacterias intestinales.

En la Figura 2, se puede observar que *Lactobacillus* está presente en el 81,9 % de las muestras provenientes de la Región de Los Ríos y en el 43,9 % de las muestras de la Región de Los Lagos. *Bifidobacterium*, en cambio, se detectó en 13,9 % de las muestras de la Región de los Ríos y en 53,7 % en la Región de Los Lagos.

Figura 2. Prevalencia de géneros de bacterias lácticas identificadas en el intestino de *A. mellifera* de la Región de Los Ríos y de los Lagos, analizadas según el total de cada región ($n=154$).



Cuatro aislados bacterianos fueron identificados en el género *Weissella*, 2 aislados provenientes de la Región de Los Ríos y 2 de la Región de Los Lagos. *Weissella* es un género que ha demostrado que estimula la respuesta del sistema inmunológico de las abejas (Yoshiyama, 2013) y algunas especies de este género han sido aisladas de diversas fuentes, como jugo de zanahoria, caña de azúcar, aguas residuales y leche (Koort *et al.*, 2006). Por otra parte, *Lactococcus* fue el género con menor prevalencia y sólo representa el 0,55 % (n=1/183) de las bacterias identificadas en la Región de Los Ríos (Figura 2). Algunas de las especies de este género han sido investigadas por sus efectos antibióticos y su efectividad en el control de loque americano (*Paenibacillus larvae*) (Janashia *et al.*, 2016).

Al realizar el análisis para identificar las bacterias a nivel de especies se identificaron 6 especies de bacterias generadoras de ácido láctico de las 183 bacterias analizadas, las que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia de especies de bacterias lácticas en el intestino de *A. mellifera* del sur de Chile, analizados por región.

Especies Identificadas	Los Ríos (%) (n=72)	Los Lagos (%) (n=82)
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	81,9	40,2
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	13,9	53,7
<i>Weissella bombi</i>	2,8	2,4
<i>L. helsingborgensis</i>	0,0	2,4
<i>L. panisapium</i>	0,0	1,2
<i>Lactococcus lactis</i>	1,4	0,0

Las especies que más predominan son *Lactobacillus kunkeei* y *Bifidobacterium asteroides* (Tabla 2). Las especies encontradas coinciden con los estudios realizados por distintos autores, los cuales muestran similitud en las bacterias lácticas más frecuentes (Olofsson y Vásquez, 2008; Tajabadi *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2009).

Lactobacillus kunkeei es la especie que más prevalece en intestinos de las abejas colectadas en el sur de Chile, representando un 58,4 % en la Región de Los Ríos y 40,2 % en la Región de Los Lagos. Esta bacteria se ha encontrado en

abejas melíferas, larvas, miel fresca y polen de abeja (Endo y Salminen, 2013), como también se ha aislado desde flores (Neveling *et al.*, 2012) y vino (Edwards *et al.*, 1998), lo que sugiere que pueden tener otros hábitats naturales fuera del intestino de la abeja (McFrederick *et al.*, 2012). Además, ha sido eficiente en el control del Loque europeo (*Melissococcus plutonius*) (Endo y Salminen, 2013). Otras especies de este género fueron encontradas en muestras de la Región de los Lagos, *L. helsingborgensis* y *L. panisapium* con prevalencia de 2,44 % y 1,22 %, respectivamente. Olofsson y Vásquez (2008) han encontrado variadas especies pertenecientes a este mismo género, como *L. kunkeei*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, *L. vermiform* y *Lactobacillus sp.*, lo que sugiere que existe una amplia diversidad de especies de este género asociada a la microbiota intestinal de las abejas melíferas.

Por otra parte, *Bifidobacterium asteroides* fue detectada en un 9,9 % en abejas provenientes de la Región de Los Ríos y 53,6 % en abejas de la Región de Los Lagos.

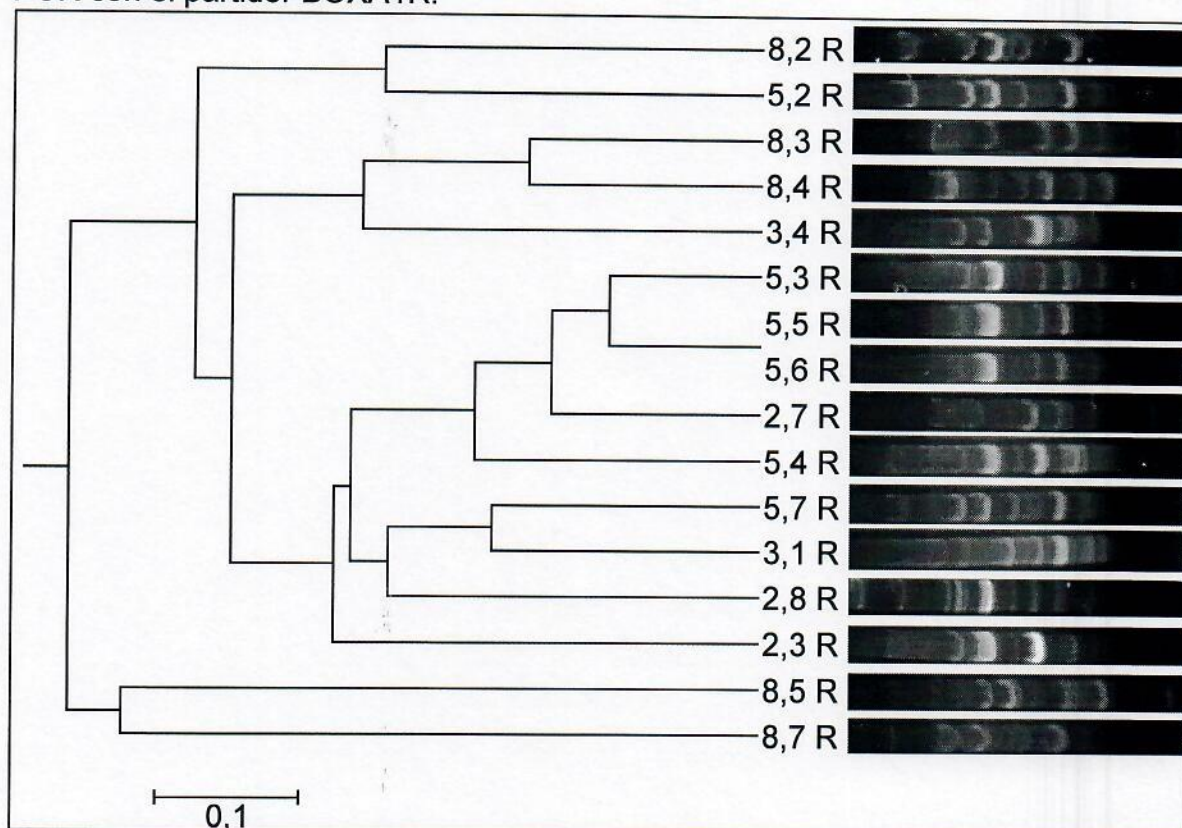
Bifidobacterium asteroides es una bacteria aeróbica facultativa (Bottacini *et al.*, 2012), debido a esto y a las técnicas de aislamiento utilizada en el presente estudio esta es la única especie de *Bifidobacterium* que podría haber crecido en el medio de cultivo. Cabe destacar que existen más de 30 especies reconocidas dentro del género *Bifidobacterium* (Masco *et al.*, 2003) y en el intestino de las abejas se han detectado *B. coryneforme*, *B. indicum*, *B. actinocoloniforme* y *B. bohemicum*, pero estas son anaeróbicas estrictas (Bottacini *et al.*, 2012), por lo tanto, no podrían haber sido detectadas en este estudio.

En el presente estudio las abejas fueron colectadas en otoño, por lo cual, la microbiota detectada podría variar si la colecta fuera realizada en otra estación del año, ya que estudios revelan que la cantidad y la diversidad de microbiota benéfica (LAB) detectable es estacional y dependiente de la fuente y la cantidad de néctar (Tajabadi *et al.*, 2011b; Vásquez *et al.*, 2009). Autores afirman que durante los meses de verano *L. kunkeei* es la bacteria más frecuente en el intestino de las abejas (Mc Frederick *et al.*, 2014; Corby Harris *et al.*, 2014).

Diversidad genética

Se utilizó la técnica de BOX-PCR para mostrar la diversidad genética entre las cepas y descartar copias idénticas. Se utilizaron 172 aislados, los cuales fueron agrupados según especie y analizados al azar en 8 cladogramas generados con los programas AFLP-SURV y PHYLIP.

Figura 3. Cladograma de las relaciones genéticas entre aislados bacterianos de *Lactobacillus kunkeei* de la Región de Los Lagos, de acuerdo al producto de BOX-PCR con el partidor BOXA1R.



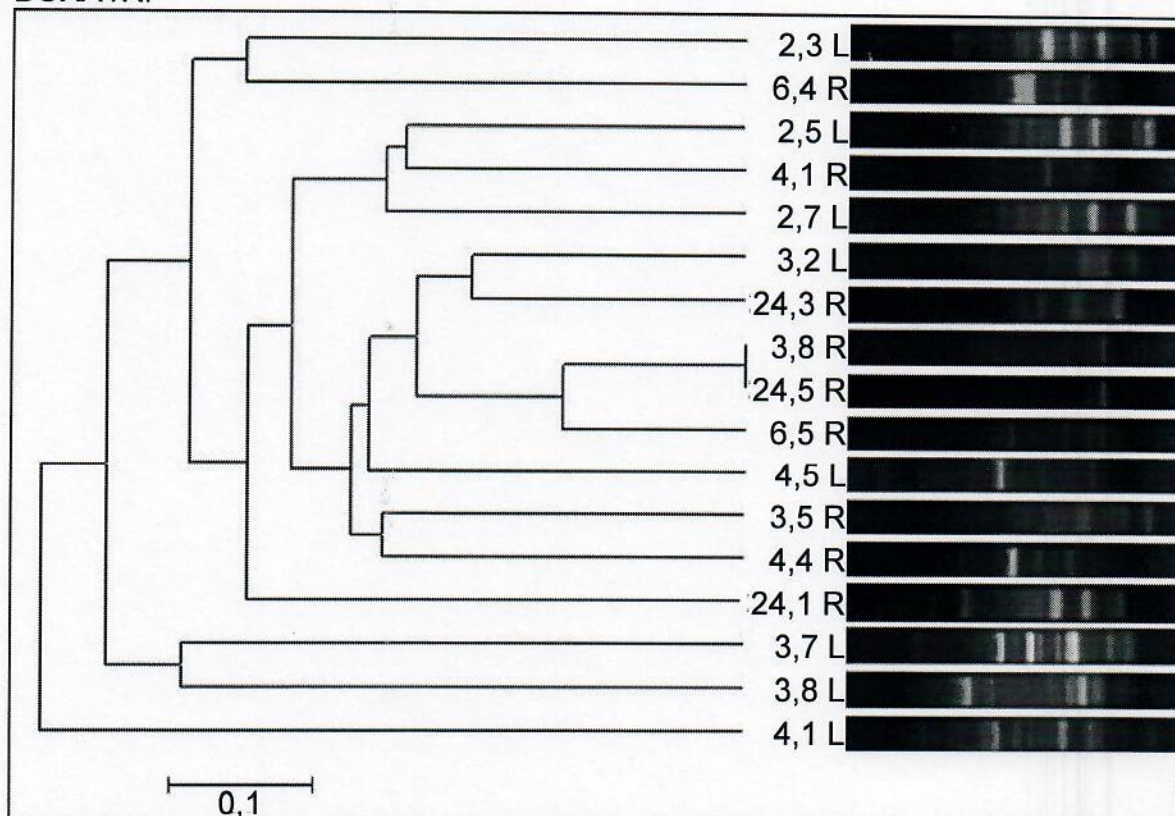
De las 121 bacterias *Lactobacillus kunkeei* analizadas se determinó la existencia de 106 cepas diferentes, es decir, 15 cepas idénticas fueron descartadas. En este sentido, en el cladograma construido en base a las huellas genéticas y la matriz binaria (Figura 3) se pueden observar 16 de los aislados de *L. kunkeei*, donde 14 fueron genéticamente únicos, correspondiendo a cepas genéticamente distintas. El cladograma posee dos brazos principales, donde el primero contiene a la mayoría de los aislados (8.2 R, 5.2 R, 8.3 R, 8.4 R, 3.4 R, 5.3 R, 5.5 R, 5.6 R, 2.7 R, 5.4 R, 5.7 R, 3.1 R, 2.8 R, 2.3 R) y el segundo posee a las muestras 8.5 R y 8.7 R, que tienen una distancia genética del 40 % respecto al resto. Las muestras 5.5

R y 5.6 R fueron genéticamente idénticas entre sí, debido a esto se descartó una de las dos. También se puede observar que la muestra 5.3 R posee una distancia genética del 10 % de las muestras nombradas anteriormente.

Asenjo *et al.* (2016) sugieren que existe un alto grado de variabilidad genética ente cepas de *L. kunkeei* e indican que la versatilidad, lo cual le otorga una mayor versatilidad y la habilidad de sobrevivir en diferentes nichos ecológico (intestinos de abejas, flores, frutos, entre otros).

En análisis por BOX-PCR de *Bifidobacterium asteroides* se analizaron 51 bacterias y los resultaron mostraron la existencia de 42 cepas diferentes, es decir, 9 cepas idénticas fueron descartadas.

Figura 4. Cladograma de las relaciones genéticas entre aislados bacterianos de *Bifidobacterium asteroides*, de acuerdo al producto de BOX-PCR con el partidor BOXA1R.



El cladograma presentado en la Figura 4, muestra la huella genética de 17 aislados bacterianos pertenecientes a la especie *Bifidobacterium asteroides*, donde se observa que el aislado 3.8 R es idéntico al aislado 24.5 R. Además se

puede ver que existen tres brazos principales, el primero contiene la mayoría de los aislados (2.3 L, 6.4 R, 2.5 L, 4.1 R, 2.7 L, 3.2 L, 24.3 R, 3.8 R, 24.5 R, 6.5 R, 4.5 L, 3.5 R, 4.4 R, 24.1 R), el segundo brazo contiene las muestras 3.7 L y 3.8 L que poseen una distancia genética del 39 % entre sí y 45 % respecto a las muestras del primer brazo. Así mismo, se puede ver en el último brazo al aislado 4.1 L, que tiene una distancia genética del 50 % con respecto las demás muestras.

El presente estudio demostró que existe una variedad genética en la mayoría de las cepas, evidenciando una gran diversidad genética dentro de la misma especie.

Las cepas diferenciadas fueron ingresadas a la colección bacteriana de la Facultad de Agronomía, para los siguientes estudios relacionados al proyecto en curso.

CONCLUSIONES

1. Existen diversas Lactobacterias en el intestino de las abejas melíferas del sur de Chile.
2. Los géneros más prevalentes en el intestino de las abejas del sur de Chile fueron *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
3. La especie más prevalente en el intestino de las abejas de la Región de los Ríos es *Lactobacillus kunkeei* y en la Región de Los Lagos fue *Bifidobacterium asteroides*.
4. Existe una amplia diversidad genética en las especies *Lactobacillus kunkeei* y *Bifidobacterium asteroides*, aisladas del intestino de *Apis mellifera* en el sur de Chile.

REFERENCIAS

1. Aguilar, R., L. Ashworth, L. Galetto and M.A. Aizen. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol. Lett.* 9(8): 968-980.
2. Alberoni, D., F. Gaggia, L. Baffoni and D. Di Gioia. 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100(22): 9469-9482.

3. Alins, E. 1980. Guía práctica del apicultor. Sintesis. Barcelona, España.
4. Araneda, X., M. Cumian and D. Morales. 2015. Distribution, epidemiological characteristics and control methods of pathogen *Nosema ceranae* Fries in honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Arch. Med. Vet. 47(2): 129-138.
5. Arredondo, D., L. Castelli, M.P. Porrini, P.M. Garrido, M.J. Eguaras, P. Zunino and K. Antúnez. 2017. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. Benef. Microb. 9(2): 279-290 [en línea].
6. Asenjo, F., A. Olmos, P. Henríquez-Piskulich, V. Polanco, P. Aldea, J.A. Ugalde and A.N. Trombert. 2016. Genome sequencing and análisis of the first complete genome of *Lactobacillus kunkeei* strain MP2, an *Apis mellifera* gut isolate. PeerJ DOI 10.7717/peerj.1950 [en línea].
7. Audisio, M.C., M.J. Torres, D.C. Sabaté, C. Ibarguren and M.C. Apella. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. Microbiol. Res. 166(1): 1-13.
8. Bottacini, F., C. Milani, F. Turrone, B. Sánchez, E. Foroni, S. Duranti, F. Serafini, A. Viappiani, F. Strati, A. Ferrarini, M. Delledonne, B. Henrissat, P. Coutinho, G.F. Fitzgerald, A. Margolles, D. van Sinderen and M. Ventura. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. PLoS One 7(9) doi:10.1016/j.micres.2010.01.003 [en línea].
9. Calderone, N.W. 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. PLoS One 7(5) doi:10.1371/journal.pone.0037235 [en línea].
10. Corby-Harris, V., P. Maes and K.E. Anderson. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. PLoS One 9(4) doi:10.1371/journal.pone.0095056 [en línea].
11. Edwards, C.G., K.M. Haag, M.D. Collins, R.A. Hutson and Y.C. Huang. 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. J. Appl. Microbiol. 84(5): 698-702.
12. Endo, A. and S. Salminen. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 36(6): 444-448.

13. Engel, P., R.R. James, R. Koga, W.K. Kwong, Q.S. McFrederick and N.A. Moran. 2013. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *J. Apic. Res.* 52(4): 1-24.
14. Evans, J.D. and M. Spivak. 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103(Suppl. 1): S62-S72.
15. Felsenstein, J. 2014. PHYLIP [en línea]. University of Washington, USA. <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. [Consulta: 18 diciembre 2017].
16. Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez and I. Fries. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41(1): 99-108.
17. Gallai, N., J.-M. Salles, J. Settele and B.E. Vaissière. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68(3): 810-821.
18. Guiñazu, L.B., J.A. Andrés, M. Rovera, M. Balzarini and S.B. Rosas. 2013. Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. *in vitro*. *Eur. J. Soil Biol.* 54: 69-77.
19. Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, P. García Palencia and A. Meana. 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 97(1): 76-78.
20. Janashia, I., Y. Choiset, H. Rabesona, N. Hwanhlem, N. Bakuradze, N. Chanishvili and T. Haertlé. 2016. Protection of honeybee *Apis mellifera* by its endogenous and exogenous lactic flora against bacterial infections. *Ann. Agrar. Sci.* 14(3): 177-181.
21. Klein, A.-M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 274(1608): 303-313.
22. Koort, J., T. Coenye, E.M. Santos, C. Molinero, I. Jaime, J. Rovira, P. Vandamme and J. Bjorkroth. 2006. Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with "Morcilla de Burgos". *Int. J. Food Microbiol.* 109(1-2): 164-168.

23. Masco, L., G. Huys, D. Gevers, L. Verbruggen and J. Swings. 2003. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *System. Appl. Microbiol.* 26(4): 557-563.
24. McFrederick, Q.S., W.T. Wcislo, D.R. Taylor, H.D. Ishak, S.E. Dowd and U.G. Mueller. 2012. Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol. Ecol.* 21(7): 1754-1768.
25. McFrederick, Q.S., W.T. Wcislo, M.C. Hout and U.G. Mueller. 2014. Host species and developmental stage, but not host social structure, affects bacterial community structure in socially polymorphic bees. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 88(2): 398-406.
26. Moran, N.A., A.K. Hansen, J.E. Powell and Z.L. Sabree. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One* 7(4) doi:10.1371/journal.pone.0036393 [en línea].
27. Morse, R.A. and N.W. Calderone. 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000 [en línea]. A.I. Root Company, USA. <<https://beyondpesticides.org/assets/media/documents/pollinators/document/s/ValueofHoneyBeesasPollinators-2000Report.pdf>>. [Consulta: 21 noviembre 2017].
28. Neveling, D.P., A. Endo and L.M.T. Dicks. 2012. Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee-hives. *Curr. Microbiol.* 65(5): 507-515.
29. Olofsson, T.C. and A. Vásquez. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* 57(4): 356-363.
30. Ouwehand, A.C., S. Salminen and E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Leeuwenhoek* 82(1-4): 279-289.
31. Potts, S.G., J.C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger and W.E. Kunin. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25(6): 345-353.
32. Rodríguez, M., M. Vargas, M. Gerding, H. Navarro and K. Antúnez. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J. Apic. Res.* 51(3): 285-287.

33. Schmid, M.R., A. Brockmann, C.W.W. Pirk, D.W. Stanley and J. Tautz. 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 54(2): 439-444.
34. Schwarz, R.S., Q. Huang and J.D. Evans. 2015. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10: 1-7 doi: 10.1016/j.cois.2015.04.006 [en línea].
35. Spivak, M., E. Mader, M. Vaughan and N.H. Euliss. 2011. The plight of the bees. *Environ. Sci. Technol.* 45(1): 34-38.
36. Tajabadi, N., M. Mardan, M.A. Manap, M. Shuhaimi, A. Meimandipour and L. Nateghi. 2011. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie* 42(5): 642-649.
37. VanEngelsdorp, D., J.D. Evans, C. Saegerman, C. Mullin, E. Haubruge, B.K. Nguyen, M. Frazier, J. Frazier, D. Cox-Foster, Y. Chen, R. Underwood, D.R. Tarpy and J.S. Pettis. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS One* 4(8) doi: 10.1371/journal.pone.0006481 [en línea].
38. Vásquez, A., T.C. Olofsson and D. Sammataro. 2009. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA - A comparison with bees from Sweden. *Apidologie* 40(1): 26-28.
39. Vekemans, X. 2002. AFLP-SURV 1.0. A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data [en línea]. Université Libre de Bruxelles, Belgium.
<http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/fichiers/manual_AFLPsurv.pdf>.
[Consulta: 07 enero 2018].
40. Velis, H., P. Silva y M. Nuñez. 2009. Producción apícola, informe anual 2008. Instituto Nacional de Estadísticas. Santiago, Chile.
41. Verde, M. 2011. Bienestar animal en la apicultura. El bienestar de las colmenas. *Rev. Cuba. Cienc. Vet.* 32(1): 26-31.
42. Versalovic, J., M. Schneider, F.J. de Bruijn and J.R. Lupski. 1994. Genomic Fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5(1): 25-40.
43. Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.

44. Yoshiyama, M., M. Wu, Y. Sugimura, N. Takaya, H. Kimoto-Nira, and C. Suzuki. 2013. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. J. Invertebr. Pathol. 112(1): 62-67.