

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DESDE ABEJAS DE LA ZONA
SUR DE CHILE**

POR

CAMILA ALEJANDRA SANTANDER CAMPOS

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

**CHILLÁN – CHILE
2023**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DESDE ABEJAS DE LA ZONA
SUR DE CHILE**

POR

CAMILA ALEJANDRA SANTANDER CAMPOS

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

**CHILLÁN – CHILE
2023**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.

Ing. Agrónomo, Dra.

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.

Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Profesor, Nolberto Arismendi S.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs. Agr. Dr. Cs.

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.

Ing. Agrónomo, Mg. Sc.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FIA PYT 2017-0241 (2017-2020) “Desarrollo de un bioestimulante probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *Apis 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 TABLAS

		Página
Tabla 1	Lactobacteria según su especie y región geográfica.....	6
Tabla 2	Crecimiento de cepas de lactobacterias en pH ácidos en hora cero y hora tres.....	10
Tabla 3	Crecimiento de cepas de lactobacterias en hora cero y hora tres en diferentes medios.....	12
Tabla 4	Presencia o ausencia de halo de inhibición de lactobacteria ante <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	13

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DESDE ABEJAS DE LA ZONA SUR DE CHILE

IN VITRO CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BEES IN SOUTHERN CHILE

Palabras índice adicionales: *Apis mellifera*, lactobacterias, enzimas digestivas.

RESUMEN

La apicultora a perfeccionado la crianza de abejas melíferas, son las principales encargadas de la polinización lo cual genera un gran impacto en la producción agrícola que se atribuye entre un 5 % y 8 % a nivel mundial. Algunas bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son destacadas entre los microorganismos usados como probióticos. El objetivo del estudio es comprobar si las lactobacterias aisladas desde el intestino de abejas de la zona sur de Chile podrían ser consideradas probióticas. Para ello se sometieron 18 cepas de lactobacterias pertenecientes a las especies *Apilactobacillus kunkeei* y *Bifidobacterium asteroides* previamente aisladas a pruebas *in vitro* para medir su tolerancia a pH ácidos, medios con enzimas gástricas, actividad hemolítica y actividad antimicrobial; todas estas pruebas son necesarias para saber si son bacterias potenciales probióticas que podrían sobrevivir en el tracto digestivo humano. Según los resultados obtenidos se descartó que tuvieran este potencial probiótico porque, aunque no realizan hemólisis, no son capaces de sobrevivir en medios ácidos y no pueden desarrollarse en medios con enzimas digestivas. Hay que destacar que todas cepas de *Apilactobacillus kunkeei* cuentan con actividad antimicrobial frente a otras bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

The beekeeper has perfected the breeding of honey bees, they are the main ones

in charge of pollination, which generates a great impact on agricultural production that is attributed between 5% and 8% worldwide. Some bacteria belonging to the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are prominent among the microorganisms used as probiotics. The objective of the study is to verify if the lactobacteria isolated from the intestine of bees from the southern zone of Chile could be considered probiotics. To this end, 18 strains of lactobacteria belonging to the species *Apilactobacillus kunkeei* and *Bifidobacterium asteroides* previously isolated were subjected to *in vitro* tests to measure their tolerance to acidic pH, media with gastric enzymes, hemolytic activity, and antimicrobial activity; all these tests are necessary to know if they are potential probiotic bacteria that could survive in the human digestive tract. According to the results obtained, it was ruled out that they had this probiotic potential because, although they do not perform hemolysis, they are not capable of surviving in acidic media and cannot develop in media with digestive enzymes. It should be noted that all strains of *Apilactobacillus kunkeei* have antimicrobial activity against other bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

La zoopolinización es realizada principalmente por insectos los cuales son responsable en su mayoría de la producción agrícola de alimentos y es clave en el servicio ecosistémico (Miñarro *et al.*, 2018). Las abejas son los mayores polinizadores de muchas plantas silvestres y monocultivos (Martin-Culma y Arenas-Suárez, 2018). Estas necesitan el néctar de las flores como alimento para sobrevivir, mientras que las plantas las necesitan para esparcir su polen y así reproducirse (Kiymaci *et al.*, 2023). A través de la apicultura el ser humano a perfeccionado técnicas asociadas para lograr el manejo de la abeja la cual entrega múltiples beneficios tales como polinizar cultivos, producir miel, propóleo y jalea real; que se utilizan como suplementos dietéticos por su amplio valor nutricional (Alberoni *et al.*, 2018).

El género *Apis* tiene origen en el continente asiático en zonas tropicales y

subtropicales para luego trasladarse a África y posteriormente a Europa (Ruttner, 1988). A Chile arribó en el año 1844 provenientes de Italia específicamente la especie *Apis mellifera* con el principal objetivo de polinizar frutales (Huerta-Rivero *et al.*, 2022). Se estima que el 75 % de los cultivos frutícolas, el 48 % de las hortalizas y el 36 % de semillas, podría verse impactado en rendimiento y calidad de la cosecha en diferentes niveles si se ausentaran estos agentes polinizantes (FAO, 2018). A su vez también se estima que entre el 5 % y el 8 % de la actual producción agrícola es directamente atribuible a la zoopolinización lo que representa entre 235.000 y 577.000 millones de dólares a nivel mundial (FAO, 2018). En Chile la producción de miel ocupa el puesto número 30 entre lo más exportado del país, la producción nacional oscila entre los 7 mil y 11 mil toneladas anuales (Lobos y Pávez, 2021).

Actualmente las abejas están sufriendo una crisis y una drástica disminución alrededor del mundo, a causa de monocultivos, que dejan cada vez menos alimento para estos polinizadores, así como el uso de plaguicidas, fungicidas y herbicidas que se asocian también al descenso de estos y otros insectos (Huerta-Riveros *et al.*, 2022). Otro factor que atribuible es el cambio climático, el cual ha propiciado temporales erráticos, y heladas tempranas, lo cual no favorece las condiciones para el óptimo desarrollo de la flora apícola (Huerta-Riveros *et al.*, 2022). Para combatir esto y favorecer su reproducción estudios anteriores han registrado un aumento significativo en postura de crías, ingreso de polen y miel cosechable en colmenas que han sido rociadas con jarabe de azúcar que tenía añadido lactobacterias obtenidas desde el intestino de abejas (Alberoni *et al.*, 2018), también se detectó que las bacterias intestinales cuentan con la capacidad de limitar la proliferación de enfermedades importantes como el virus de las alas deformadas (Moran, 2015). Las abejas son hospedadores de un conjunto de bacterias, virus y eucariotas que interactúan entre sí y con el sistema inmunológico de su hospedador generando el desarrollo de una enfermedad o las defensas para poder evitarla (Clemente *et al.*, 2012). Gracias a características de las bacterias intestinales podrían usarse como probióticos (Kwong *et al.*, 2014).

Los probióticos, según la definición de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), son "microorganismos vivos", cuando se administran en cantidades adecuadas, brindan beneficios para la salud del huésped (Mohammad *et al.*, 2020). Algunas bacterias que pertenecen al género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son más prominentes entre los microorganismos usados como probióticos (Kiymaci *et al.*, 2023). El género *Lactobacillus* posee microorganismos esenciales en la homeostasis dentro del intestino y favorece la inhibición de algunos patógenos, gracias a la producción de ácidos lácticos y acéticos a partir de la lactosa (Pachla *et al.*, 2018) además que asegura actividades enzimáticas para la absorción de nutrientes para facilitar una vigorosa respuesta inmunitaria contra invasores no deseados (Alberoni *et al.*, 2018). Algunas especies son capaces de metabolizar la fructosa de la fruta esto alcanza un interés particular, porque podría mejorar el síndrome del intestino irritable en humanos (Filannino *et al.*, 2019), también estudios recientes han demostrado que algunas cepas de *Apilactobacillus kunkeei* pueden disminuir hasta un 50 % el colesterol (Vergalito *et al.*, 2020). Respecto a las lactobacterias de la especie *Bifidobacterium* juegan un papel central en la función del catabolismo de carbohidratos, por lo tanto, aportan en la nutrición de sus hospedadores (Lee *et al.*, 2015); otras cepas cuentan con propiedades antimicrobianas lo que sugiere la posibilidad de inhibición de potenciales patógenos (Killer *et al.*, 2014). Análisis genéticos han revelado que una mayor diversidad genética de colonias bacterianas en el intestino favorece la producción de toxinas que pueden afectar a los parásitos de la abeja (Koch y Schmid-Hempel, 2012).

Las lactobacterias se usaron originalmente para mejorar la salud de los animales y los humanos a través de la mejora de la salud intestinal, la mejora de la respuesta inmunitaria, la reducción del colesterol sérico y la prevención del cáncer (Elzeini *et al.*, 2021). En las abejas melíferas criadas en un entorno natural se sabe que las bifidobacterias y los lactobacilos confieren beneficios para la salud de su huésped y se encuentran en la microbiota intestinal debido a que fueron ingeridas desde el néctar y el polen (Alberoni *et al.*, 2018; Corby-harris *et al.*, 2014).

En estudios previos se han estudiado los beneficios de las lactobacterias de origen apícola al ser humano, para ello es necesario que logre sobrevivir al tracto digestivo por lo menos durante tres horas y sobreviva al pH ácido del estómago que oscila entre 2,0 – 3,0 en algunos casos llegando hasta 1,0 (Moreno, 2012). Otro requisito por cumplir es que produzca sustancias que inhiban el desarrollo de otros microorganismos nocivos (Fernández-Roblero *et al.*, 2020). Para seleccionar lactobacterias con actividad probiótica es necesario descartar la actividad hemolítica de estas (Elzeini *et al.*, 2021). Esto se puede realizar cultivando las lactobacterias en medio agar sangre, donde la γ - hemólisis implica que no hay descomposición de los glóbulos rojos de la sangre (sin halos alrededor de las colonias) o β - hemolisis implica la descomposición de los glóbulos rojos (se observan halos alrededor de la colonia) y α - hemólisis lo que implica toxicidad (halos de tonos verdes alrededor de las colonias) (Moreno, 2012).

Las lactobacterias en general, son reconocidas como seguras para el consumo humano y pueden ser encontradas en distintos productos de la colmena, que forman parte de la dieta humana, como la miel y el propóleo, esto sugiere un posible uso como probiótico humano que favorecería la nutrición (Vergalito *et al.*, 2020). En este sentido, la miel cuenta con calidades prebióticas que puede ayudar a que predominen microorganismos probióticos que favorecen la salud y además la resistencia hacia infecciones del hospedador (Mustar y Ibrahim, 2022). En investigaciones previas realizadas por Diaz *et al.* (2021), se caracterizaron *in vitro* las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* ssp. aisladas del tracto digestivo de abejas. En base a los antecedentes anteriores el objetivo de la siguiente investigación es determinar si lactobacterias aisladas desde el intestino de abejas melíferas tienen características para ser consideradas probióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos fueron ejecutados en el laboratorio de Virología y en el laboratorio de Sanidad Apícola del Departamento de Producción Vegetal en la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile.

Las lactobacterias fueron previamente aisladas desde el intestino de abejas que fueron recolectadas desde distintos apiarios ubicados en la zona sur de Chile e identificadas a nivel de especie (Tabla 1), en el marco del proyecto FIA PYT 2017-0241 (2017 - 2020) “Desarrollo de un bioestimulante probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *Apis mellifera* frente a los patógenos DWV y *Nosema ceranae* y su adaptación al cambio climático”.

Tabla 1. Lactobacteria según su especie y región geográfica.

Cepa lactobacteria	Especie	Región geográfica
LL14.4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Lagos
LL15.1	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Lagos
LL20.4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Lagos
LR13.27	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LL5.5	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Lagos
LL5.7	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Lagos
LR10.2	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR8.3	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR2.8	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR5.4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR6.5	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Ríos
LR24.3	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Ríos
LR17.12	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR13.34	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LR20.4	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Ríos
LL13.9	<i>Apilactobacillus kunkeei</i>	Los Lagos
LL6.1	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Lagos
LL7.1	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	Los Lagos

Activación de bacterias

Las lactobacterias fueron activadas desde tubos criogenizados a - 80 °C tomando una alícuota de 10 µL que fue depositada en un tubo Falcon de 15 mL con solución

MRS (Man, Rogosa y Sharpe) estas fueron cultivadas en una cámara oscura durante 24 h a una temperatura de 32 °C para favorecer su multiplicación. Posteriormente el cultivo bacteriano fue separado del sobrenadante para ello se centrifugó en centrífuga eppendorf 5804 a 4 °C durante 5 min a 10.000 g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet bacteriano fue resuspendido en una solución buffer PBS (tampón fosfato salino) a pH 7,4. El proceso anterior se replicó dos veces para eliminar los residuos del medio MRS. El pellet bacteriano ya lavado fue resuspendido en 15 mL de solución PBS y se extrajo 10 muestras de 1 mL que se depositaron en tubos eppendorf de 1,5 mL. A un tubo se añadió glicerol al 80 % para volver a criogenizar y los demás fueron ocupados durante el ensayo. Para igualar la cantidad de lactobacterias de cada cepa se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm se estandarizó a densidad uno para esto se equilibró con solución PBS a pH 7,4.

Resistencia a pH ácidos

El cultivo bacteriano (1 mL) depositado en tubos eppendorf fue centrifugado a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Al pellet bacteriano se le eliminó el sobrenadante y fue suspendido en 1 mL de solución buffer PBS con valores de pH 1,0, 2,0 y 3,0 ajustados añadiendo ácido clorhídrico (HCl). Estos tubos fueron incubados durante 3 h a 37 °C dentro de una cámara oscura (Ugras, 2017). A la 0 h se realizó diluciones seriadas del cultivo (10^{-2} a 10^{-6}) para sembrar 10 μ L en placas con agar MRS, estas se incubaron por 24 h a 37 °C. El mismo proceso de sembrado se replicó con las lactobacterias que fueron incubadas por 3 h. y a su vez se repitió en cada cepa. Transcurridas 24 h se efectuó el recuento de número de unidades formadoras de colonias (UFC) en cada gota de 10 μ L depositado en el agar.

Determinación de resistencia a pepsina

El cultivo bacteriano (1 mL) depositado en tubos eppendorf fue centrifugado a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Al pellet bacteriano se le eliminó el sobrenadante y fue suspendido en tubos eppendorf con 1 mL de solución buffer PBS con pepsina (3 mg mL⁻¹) con valores de pH 1.0, 2.0 y 3.0 estos fueron incubados durante 3 h a 37 °C dentro de una cámara oscura (Ugras, 2017). A la 0 h se realizó diluciones seriadas

(10^{-2} a 10^{-6}) y se sembró una alícuota de 10 μ L de cada dilución en agar MRS para dejar incubando por 24 h a 37 °C. El mismo proceso se replicó con las lactobacterias que se incubaron por 3 h. Y a su vez se repitió en cada cepa. Transcurridas 24 h se efectuó recuento de número de UFC en cada gota de 10 μ L depositado en el agar.

Determinación resistencia a pancreatina

El cultivo bacteriano (1 mL) depositado en tubos eppendorf fue centrifugado a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Al pellet bacteriano se le eliminó el sobrenadante y fue suspendido en 1 mL de solución buffer PBS con pancreatina (1 mg mL⁻¹) a pH 8 para ser incubado durante 3 h a 37 °C dentro de cámara oscura (Ugras, 2017). A la 0 h se realizó diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) para sembrar en placas con agar MRS se depositó 10 μ L a las placas se incubaron por 24 h a 37 °C. El mismo proceso se replicó con las lactobacterias que se incubaron por 3 h. Y a su vez se repitió en cada cepa. Transcurridas 24 h se efectuó recuento de número de UFC en cada gota de 10 μ L depositado en el agar.

Determinación actividad hemolítica

Cada lactobacteria activada (1 mL) y depositada en tubos eppendorf fue centrifugada a 10.000 g por 5 min a 4 °C. Al pellet bacteriano se le eliminó el sobrenadante y fue suspendido en 1 mL de solución buffer PBS pH 7,4 (Ugras, 2017). En medio agar Columbia que tiene añadido 5 % de sangre de cordero defibrinada, se depositaron dos alícuotas (10 μ L cada una) de las cepas de lactobacterias y fueron comparadas con un probiótico comercial en base a *Lactobacillus plantarum*. Las placas se incubaron en cámara oscura por 48 h para evaluar presencia o ausencia de halo de hemolisis.

Determinación de actividad antimicrobial

Cada lactobacteria activada (1mL) fue centrifugada a 10.000 g por 5 min a 4 °C. El pellet bacteriano precipitó y el sobrenadante fue eliminado. El pellet fue suspendido en 1 mL de solución buffer PBS pH 7,4 (Ugras, 2017).

Las bacterias patógenas con las cuales se midió la actividad antimicrobiana de las lactobacterias fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se realizaron cultivos bacterianos en tubos Falcón con 15 mL de caldo nutritivo inoculado con 10

μL de la bacteria; estos fueron incubados por 24 h a 32 °C en cámara oscura. Luego fueron centrifugados a 13.000 g por 15 min y 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y la bacteria patógena fue suspendida en 10 mL de solución buffer PBS. En agar MRS se depositaron 100 μL de la bacteria patógena y fue esparcida con aza para formar un césped, sobre él se depositaron dos alícuotas de 10 μL de cada una de las cepas de lactobacterias y así mismo una lactobacteria comercial en base a *Lactobacillus plantarum*, ocupada como control. Posteriormente las placas fueron incubadas a 32 °C por 48 h en una cámara oscura, con el propósito de observar la presencia o ausencia de halo de inhibición.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos del recuento de colonias de bacteria en los distintos pH. Para ello el número de colonias (UFC mL^{-1}) fue estandarizado y transformado a logaritmo en base 10.

RESULTADOS Y DISCUSION

Resistencia a pH ácidos. Ninguna lactobacteria logró tolerar los medios con pH 1 y 2 en el transcurso de incubación de 3 h. En el medio de pH 2 en el tiempo cero lograron proliferar algunas colonias como fue el caso de las cepas LR13.27, LR10.2, LR8.3 y LL6.1, pero presentaron una tasa de mortalidad del 100 % transcurrido el tiempo de incubación (Tabla 2). La alta concentración de ácido clorhídrico permite imitar las condiciones del estómago, ya que es conocido como un fuerte agente oxidante que inhibe directamente la acción metabólica de compuestos importantes como ácidos grasos, proteínas y ADN (Moreno, 2012). Esto podría desencadenar una reducción de la viabilidad de las lactobacterias no cumpliendo los requisitos para ser consideradas probióticos (Moreno, 2012). Situación similar ocurrió con las lactobacterias sometidas a pH 3 donde también podrían verse afectadas por el agente oxidante. Solo las cepas LR24.3 y LL13.9 lograron sobrevivir en este medio ácido por 3 h (Tabla 2), pero la población se vio disminuida tanto que no alcanzó el 1 % de la población en ambas cepas. Un buen probiótico debe soportar al menos el pH promedio de 3 (Mohammad *et al.*, 2020). El hecho que prevalecieran algunas de estas cepas se podría deber a la activación de homeostasis donde se bombea H^+

fuera de la célula, para así aumentar la tolerancia a la acidez (Mohammad *et al.*, 2020). En estudios anteriores de Simsek *et al.* (2022) se obtuvo resultados similares donde las lactobacterias aisladas desde el intestino de abejas no presentaron tolerancia a pH bajos. El pH óptimo de crecimiento es el más favorable para el desarrollo de un organismo. En este sentido, las lactobacterias en el intestino de las abejas adultas se desarrollan a un pH 7, por lo que podrían considerarse como neutrófilas (Parra, 2010).

Tabla 2. Crecimiento de cepas de lactobacterias en pH ácidos en hora cero y hora tres.

Cepas de Lactobacteria	Contabilización de UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 1		Contabilización de UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 2		Contabilización de UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 3	
	Hora 0	Hora 3	Hora 0	Hora 3	Hora 0	Hora 3
LL14.4	--	--	--	--	8,73	--
LL15.1	--	--	--	--	8,91	--
LL20.4	--	--	--	--	8,55	--
LR13.27	--	--	3,46	--	8,45	--
LL5.5	--	--	--	--	8,25	--
LL5.7	--	--	--	--	7,65	--
LR10.2	--	--	3,49	--	8,16	--
LR8.3	--	--	3,36	--	7,30	--
LR2.8	--	--	--	--	7,97	--
LR5.4	--	--	--	--	7,14	--
LR6.5	--	--	--	--	8,29	--
LR24.3	--	--	--	--	9,40	4,87
LR17.12	--	--	--	--	8,05	--
LR13.34	--	--	--	--	8,53	--
LR20.4	--	--	--	--	8,67	--
LL13.9	--	--	--	--	9,51	2,10
LL6.1	--	--	4,09	--	8,60	--
LL7.1	--	--	--	--	8,74	--

(--): Ausencia de crecimiento de lactobacteria.

Determinación de resistencia ante la presencia de pepsina. La supervivencia de las cepas probióticas al jugo gástrico depende de su resistencia intrínseca al ambiente hostil, pero también del huésped y el vector de ingestión. En este sentido, los alimentos con un alto nivel de grasa y la presencia de ciertas proteínas en la

comida pueden proteger a las bacterias del ácido estomacal y, por lo tanto, aumentar la supervivencia al tránsito gástrico (Monteagudo-Mera *et al.*, 2012). Como se observa en la Tabla 3 el medio con pepsina y ajustado a pH 3 solo lograron sobrevivir tres cepas de lactobacterias (LR20.4, LL6.1 y LL7.1), pero presentaron una disminución en su población donde para la cepa LR20.4 solo sobrevivió el 5 % de la población inicial de bacterias y las otras dos cepas no alcanzaron el 1 % de supervivencia. El hecho de que las lactobacterias no se aislaron desde microbiota intestinal humana explicaría su intolerancia a la pepsina y pH gástrico (Simsek *et al.*, 2022). Debido a que se establece una estándar para la tasa de supervivencia por sobre del 80 % no podrían ser consideradas como probióticas (Mohammad *et al.*, 2020).

Determinación de la resistencia a la pancreatina. Si las lactobacterias transitarán por el sistema digestivo humano se verían sometidas a enzimas pancreáticas que son importantes en el metabolismo (Mohammad *et al.*, 2020). Solo seis (LL14.4, LR13.27, LR10.2, LR5.4, LR6.5 y LR24.3) de las 18 lactobacterias del presente estudio, sobrevivieron al ser sometidas en un medio en presencia de pancreatina, a las tres horas de incubación (Tabla 3). Las poblaciones pos-incubación variaron entre un 68 % y un 1 % de la población de bacterias inicial (Tabla 3). Considerando la tasa de supervivencia anteriormente mencionada ninguna podría ser considerada probiótica debido a su poca tolerancia a enzimas digestivas, lo que sugiere una baja capacidad de supervivencia en condiciones *in vivo* (Mohammad *et al.*, 2020).

Determinación actividad hemolítica. Uno de los criterios básicos para que una lactobacteria sea seleccionada como probiótica es observar que no produzca hemolisis que es la reacción de virulencia de las cepas y se puede apreciar como un halo que rodea la cepa (Elzeini *et al.*, 2021; Diaz *et al.*, 2021). En el ensayo las reacciones obtenidas al someter las lactobacterias en agar sangre fue gamma, transcurrido el tiempo de 48 horas no se presentó halo alrededor de cada una de ellas, por lo tanto, se asume que no se produjo lisis o ruptura de los glóbulos rojos lo que indicaría que no generan toxinas letales (Cabana *et al.*, 2021). A partir de esto, se atribuye que las cepas no muestran patogenicidad y son seguras para el consumo humano (Elzeini *et al.*, 2021).

Tabla 3. Crecimiento de cepas de lactobacterias en hora cero y hora tres en diferentes medios.

Cepas de Lactobacteria	UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 7,4		UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 3 con pepsina		UFC mL ⁻¹ en base log 10 a pH 8 con pancreatina	
	Hora 0	Hora 3	Hora 0	Hora 3	Hora 0	Hora 3
LL14.4	8,64	6,34	8,56	--	8,61	4,52
LL15.1	9,48	6,34	8,87	--	8,62	--
LL20.4	8,56	7,48	8,76	--	8,55	--
LR13.27	8,63	7,05	8,79	--	8,62	6,47
LL5.5	8,60	--	8,89	--	8,84	--
LL5.7	8,56	5,80	8,56	--	8,49	--
LR10.2	8,63	6,04	8,80	--	8,73	5,95
LR8.3	8,89	6,18	8,61	--	8,71	--
LR2.8	8,51	3,37	8,79	--	8,68	--
LR5.4	8,44	5,87	8,53	--	8,57	6,37
LR6.5	8,49	8,07	8,91	--	8,76	6,49
LR24.3	9,62	7,43	9,82	--	9,80	6,66
LR17.12	8,38	--	8,68	--	9,18	--
LR13.34	8,59	--	8,26	--	9,51	--
LR20.4	8,71	6,46	8,88	5,60	9,47	--
LL13.9	9,38	6,59	9,80	--	9,74	--
LL6.1	8,75	6,54	8,84	3,90	8,83	--
LL7.1	8,27	6,49	8,64	3,90	8,80	--

(--): Ausencia de crecimiento de lactobacteria.

Determinación de actividad antimicrobial. Diecisiete de las lactobacterias presentaron actividad antimicrobiana frente a la bacteria *Escherichia coli*, produciendo halos de inhibición de esta bacteria. Solo la cepa LR 20,4 no presentó actividad antimicrobiana (Tabla 4). El antagonismo producido en patógenos Gram negativos se podría deber a que los cationes desestabilizan la membrana externa y esto facilita la formación de poros en membranas citoplasmáticas rompiendo la permeabilidad de los microorganismos (Zapata *et al.*, 2009). Otro factor que a influir en la actividad antimicrobial frente a *Escherichia coli* podría ser la producción de ácidos orgánicos por parte de las lactobacterias (Suyabatmaz *et al.*, 2023). La actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas gastrointestinales es una de las propiedades más importantes y deseables en las bacterias probióticas

(Fernandez-Robleto *et al.*, 2020).

Respecto a la evaluación en *Staphylococcus aureus*, 11 de las lactobacterias presentaron actividad antimicrobiana (LL14.4, LL15.1, LL20.4, LR13.27, LR10.2, LR8.3, LR2.8, LR5.4, LR6.5, LR13.34 y LR20.4) todas las anteriores pertenecen a especie *Apilactobacillus kunkeei* y solo LR6.5 a la especie *Bifidobacterium asteroides* (Tabla 4). Basándose en investigaciones previas la actividad antimicrobiana podría deberse a la producción de diversas sustancias antimicrobianas que son responsable del fenómeno antagónico que impide el desarrollo de la bacteria gram positiva tales como son ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana llamadas bacteriocinas (Kenfack *et al.*, 2018).

Tabla 4. Presencia o ausencia de halo de inhibición de lactobacteria ante *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
LL14.4	+	+
LL15.1	+	+
LL20.4	+	+
LR13.27	+	+
LL5.5	+	-
LL5.7	+	-
LR10.2	+	+
LR8.3	+	+
LR2.8	+	+
LR5.4	+	+
LR6.5	+	+
LR24.3	+	-
LR17.12	+	-
LR13.34	+	+
LR20.4	-	+
LL13.9	+	-
LL6.1	+	-
LL7.1	+	-
Control LP	+	-

(+): Presencia de halo de inhibición; (-): Ausencia de halo de inhibición.

Mientras que el pH del estómago vacío es de 1,5 a 2,0, durante el período de

digestión el pH del estómago aumenta a 3,0 según el tipo y la cantidad de alimentos ingeridos. El intestino delgado tiene pH que oscila alrededor de 6,6 y en el intestino grueso valores cercanos a pH 7. En resumen, los pH del sistema digestivo varían entre 1,5 y 8,0 (Suyabatmaz *et al.*, 2023). Los resultados de este estudio indicaron que las cepas de lactobacterias analizadas no cumplirían los requisitos para ser consideradas probióticas ya que no sobrevivirán al tracto gástrico del ser humano. Es sabido que el paso por el tracto gastrointestinal humano puede afectar negativamente la vitalidad y funcionalidad de los microorganismos benéficos (Vergalito *et al.*, 2022). Estudios anteriores indican que lactobacterias de cepas *Apilactobacillus kunkeei* YB38, al ser ingeridas en dosis inferiores a 10 mg día⁻¹ aumenta los movimientos intestinales en mujeres con problemas de estreñimiento (Asama *et al.*, 2016) y favorece el sistema inmunológico, sin embargo, la cantidad de cepa que llega al intestino es poca, esto indica que no sobrevive al paso gástrico o se suprime de otro modo en el entorno intestinal (Asama *et al.*, 2015) su ingesta humana confirma que las lactobacterias aisladas desde abejas son seguras (Asama *et al.*, 2015) los resultados de sobrevivencia varía entre una cepa y otra. Se necesitan más investigaciones para producir probióticos seguros con alta resistencia a los microorganismos patógenos para el consumo humano y animal para el tratamiento de enfermedades (Mustar y Ibrahim, 2022)

Es favorable que cumplan con la actividad antimicrobial apuntando a remplazar antibióticos en un futuro, también son conservantes naturales que podrían incluirse en la alimentación a través de productos como la miel (Mohammad *et al.*, 2020). Ambas bacterias sobre las cuales se realizó la prueba antimicrobial mencionadas se encuentran en el intestino humano, pero también actúan como indicadores de contaminación en alimentos por lo que al presentar actividad antimicrobial sería propicio para disminuir el deterioro de alimentos con escasa refrigeración (Moreno, 2012).

Aunque los estudios *in vitro* no pueden probar completamente la actividad probiótica durante la fase de selección, si pueden usarse para caracterizar un posible mecanismo potencial y determinar la seguridad para recopilar información sobre las cepas candidatas a probióticas (Suyabatmaz *et al.*, 2023).

CONCLUSIONES

1. Las cepas de lactobacterias del presente estudio no son resistentes a pH ácidos.
2. Las cepas de lactobacterias del presente estudio no son resistentes a medios que contienen enzimas gástricas.
3. Las cepas de *Apilactobacillus kunkeei* aisladas desde el intestino de abejas melíferas tienen actividad antimicrobial frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
4. Las cepas de *Bifidobacterium asteroides* presentan actividad antimicrobial frente a la bacteria *Escherichia coli*, pero no frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

REFERENCIAS

1. Alberoni, D., L. Baffoni, F. Gaggia, P.M. Ryan, K. Murphy, P.R. Ross, C. Stanton and D. Gioia. 2018. Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. *Benef. Microbes* 9(2): 269-278.
2. Asama, T., T.-H. Arima, T. Gomi, T. Keishi, H. Tani, Y. Kimura, T. Tatefuji and K. Hashimoto. 2015. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *J. Appl. Microbiol.* 119: 816-826.
3. Asama, T., Y. Kimura, T. Kono, T. Tatefuji, K. Hashimoto and Y. Benno. 2016. Effects of heat-killed *Lactobacillus kunkeei* YB38 on human intestinal environment and bowel movement: a pilot study. *Benef. Microbes* 7(3): 337-344.
4. Cabana, M.J., M.R., Tejerina, J., José, R.M. Castro y M.R., Benítez. 2021. Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*. *Idesia* 39(1): 45–51.
5. Clemente, J.C., L.K. Ursell, L.W. Parfrey and R. Knight. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148(6):1258-1270.
6. Corby-Harris, V., P. Maes and K.E. Anderson. 2014. The Bacterial Communities Associated with Honey bee (*Apis mellifera*) Foragers. *PloS One.* 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056> [en línea].
7. Diaz, J.A., J.E. Hernandez, C.S Frizzo, K.J. Fernandez, L. Sanchez e Y. Valdivia. 2021. Caracterización *in vitro* de propiedades probióticas de *Lactobacillus*

- ssp. aislados del tracto digestivo de abejas. *Rev. Salud Anim.* 43(2): 1-13.
8. Elzeini, H. M., A.R.A.A. Ali, N.F. Nasr, M. Hassan, A.A.M. Hassan and Y.E. Elenany. 2021. Probiotic capability of novel lactic acid bacteria isolated from worker honey bees gut microbiota. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 368(6): 1-9.
 9. FAO (Italia). (2018). Es hora de apreciar la labor de los polinizadores [en línea]. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura, Italia. <http://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1129811/>. [Consulta: 06 septiembre 2022].
 10. Fernández-Roblero, S., J. Grajales-Conesa, M. Rincón-Rabanales, R. Coronel-Niño and A. Vazquez-Ovando. 2020. Lactic acid bacteria isolated from the Stingless bee honey *Scaptotrigona mexicana* and partial characterization of their probiotic activity. *Rev. Biociencias.* 7(17). <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e979> [en línea].
 11. Filannino, P., Di Cargo. R, A.Z.A. Tlais, V. Cantatore and M. Gobbetti. 2019. Fructose-rich niches traced the evolution of lactic acid bacteria toward fructophilic species. *Crit. Rev. Microbiol.* 45(1): 65-81.
 12. Huerta-Riveros, P., C. Oliva-Jara, J. Pulido-Garcés y C. Leyton-Pavez. 2022. Análisis de la miel de abeja en Chile: Un estudio de caso en el sector apícola. *Cienc. Technol.* 18(2): 1-20.
 13. Kenfack, C.H.M., P.M. Kaktcham, F.Z. Ngoufack, Y.R. Wang, L. Yin and T. Zhu. 2018. Screening and characterization of putative probiotic *Lactobacillus* Strains from HoneyBee Gut (*Apis mellifera*). *J. Adv. Microbiol.* 10(1): 1-18.
 14. Killer, J., S. Dubná, I. Sedlacek and P. Svec. 2014. *Lactobacillus apis* sp. nov., from the stomach of honeybees (*Apis mellifera*), having an *in vitro* inhibitory effect on the causative agents of American and European foulbrood. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 64: 152-157.
 15. Kiymaci, M.E., D. Simsek, K.C. Tok, D. Dirican and M. Gumastas. 2023. Probiotic potential and anti-quorum sensing activity of *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus kunkeei* isolates from *Apis mellifera*. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 73(4): 4717-4728.
 16. Koch, H. and P. Schmid-Hempel. 2012. Gut microbiota instead of host genotype drive the specificity in the interaction of a natural host-parasite system. *Ecol. Lett.* 15(10): 1095-1103.
 17. Kwong, W.K., P. Engel, H. Koch and N. Moran. 2014. Genomics and host specialization of honeybee and bumble bee gut symbionts. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA.111(31): 11509-11514.

18. Lee, F.J., D.B. Rusch, F.J. Stewart, H.R. Mattila and I.L.G. Newton. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honeybee gut microbiome. *Environ. Microbiol.* 17(3): 796–815.
19. Lobos, I. y P. Pavez. 2021. Apicultura en el territorio Patagonia Verde, Región de Los Lagos. Boletín INIA N°442. INIA Remehue. Osorno, Chile.
20. Martin-Culma, N.Y. y N.E. Arenas-Suárez. 2018. Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Cienc. Agric.* 14(1): 232-240.
21. Miñarro, M., D. García y R. Martínez-Sastre. 2018. Los insectos polinizadores en la agricultura: importancia y gestión de su biodiversidad. *Ecosistemas* 27(2): 81-90.
22. Mohammad, S.M., N.K. Mahmud-Ab-Rashid and N. Zawawi. 2020. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *J. Apic. Res.* 60(1):172–187.
23. Monteagudo-Mera, A., L. Rodriguez-Aparicio, J. Rua, H. Martinez-Blanco, N. Navasa, M.R. Garcia-Armesto and M.A. Ferrero. 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Food.* 4(2): 531–541.
24. Moran, N. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10: 22–28.
25. Moreno, L.J. 2012. Aislamiento y selección de *Lactobacillus* sp. con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis, Magister en Ciencias-Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
26. Mustar, S. and N. Ibrahim. 2022. A review of honey bees and honey as a source of probiotic and prebiotic products. *Foods* 11(14):1-17.
27. Pachla, A., M. Wicha, A.A. Ptaszyńska, G. Borsuk, U.A. Trokenheim and W. Małek. 2018. The molecular and phenotypic characterization of fructophilic lactic acid bacteria isolated from the guts of *Apis mellifera* L. derived from a Polish apiary. *J. Appl. Genet.* 59(4): 503–514.
28. Parra, R.A. 2010. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Fac. Cienc. Agropec.* 8(1): 93-105.

29. Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer. New York, USA.
30. Ugras, S. 2017. Isolation, identification and characterization of probiotic properties of bacterium from the honey stomachs of Yigilca honeybees in Turkey. Turk. J. Entomol. Derg. 41(3): 253-261.
31. Simsek, D., M.E. Kiymaci, K.C. Tok, M. Gumustas and N. Altanlar. 2022. Investigation of the probiotic and metabolic potential of *Fructobacillus tropaeoli* and *Apilactobacillus kunkeei* from apiaries. Arch. Microbiol. 204(7): 1-12.
32. Suyabatmaz, S., S.A. Karaoglu, A. Bozdeveci and R. Akpinar. 2023. Honeybee-associated lactic acid bacteria and their probiotic potential for human use. World J. Microb. Biot. 39(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03427-w> [en línea].
33. Vergalito, F., B. Testa, A. Cozzolino, F. Letizia, M. Succi, S.J. Lombardi, P. Tremonte, G. Pannella, R. Di marco, E. Sorrentino, R. Cappola and M. Iorizzo. 2020. Potential application of *Apilactobacillus kunkeei* for human use: evaluation of probiotic and functional properties. Foods 9: 2-16.
34. Zapata, S., J. Muñoz, O.I. Montoya y P.A. Gutierrez. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. Vitae 16(1): 75-82.