



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Aislamiento y Selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas

Lizeth Johanna Moreno Galarza

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2012

Aislamiento y Selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas

Lizeth Johanna Moreno Galarza

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Directora:

M.Sc. Judith Figueroa Ramírez

Grupo en Ciencia y Tecnología Apícola AYNI

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2012

Todo individuo, desde su nacimiento hasta su muerte,
coexiste con más de cien billones de células
bacterianas, diez veces más que el
número de células que habitan
en el cuerpo humano.

Luckey y Floch.

Agradecimientos

A Dios, mi padre celestial, mi guía espiritual, mi inspiración y mi luz, por el fortalecimiento y las bendiciones recibidas en mi vida.

A mi Familia, mis Padres por ser mis grandes maestros en la carrera de mi vida, a través de sus enseñanzas, esfuerzos, apoyo, educación y valores. A mis Hermanos, por su apoyo incondicional, emocional, solidario y por las experiencias compartidas en todos los momentos de nuestras vidas. A mi Abuela, mi otra Mamá, quien aparte de formarme y exigirme como persona, me consiente cariñosamente. Y a mis fieles, tiernos y traviosos Pino y Mati.

A mi Directora de tesis la Profesora Judith Figueroa Ramírez por acogerme en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, formando parte de su equipo de trabajo, por su apoyo, dedicación, confianza y enseñanzas brindadas durante este tiempo, mi más sincero sentimiento de agradecimiento, admiración y respeto.

Al Posgrado Interfacultades de Microbiología por admitirme como estudiante y brindarme la posibilidad de continuar con mi formación profesional al nivel de Maestría. A la Profesora Martha Fontanilla, quien a través de su calidad humana y de su conocimiento, forma estudiantes de posgrado íntegros. Y a Socorro Prieto, esa amiga incondicional, lista a apoyar, colaborar, enseñar, escuchar y aconsejar, siempre dispuesta con una sonrisa y un abrazo sincero.

A la Profesora Martha Quicazán, por su colaboración, amabilidad y por haber sido la primera persona que me guiara e introdujera al maravilloso mundo de las abejas. A Carlos Fuenmayor, por su incondicional colaboración. Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA, y a Don Álvaro, por su colaboración en los análisis químicos.

Al grupo AYNI, Paola Monserrate, Ivonne Hernández, Viviana Gamboa, Carla Portillo, Andrés Sánchez, César Talero y Giovanni Vargas, por haber hecho de la parte experimental de mi tesis, una experiencia inolvidable, compartiendo desde la cabina, los almuerzos, hasta los viajes (nacionales e internacionales). A Germán Suárez por su apoyo y voz de aliento en la etapa final.

A mis amigas de Maestría, Natalia Comba, Melisa Núñez y Patricia Cifuentes, por haber formado un grupo de estudio íntegro, dedicado y divertido, y a mis demás compañeros de Maestría, por compartir conocimientos y experiencias.

Al personal humano del Laboratorio de diagnóstico de Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, por su disposición y colaboración.

A Víctor Tibatá por su don de gente, colaboración y asesoría en los análisis moleculares.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, por facilitar las instalaciones y financiar los insumos para la elaboración de este estudio, en el marco del programa “Estrategias para establecer la denominación de origen de los productos de las abejas en Colombia” y del proyecto “Cualificación de productos de las abejas: Miel, Polen y Propóleos mediante indicadores microbiológicos” (código 2007C3476 111-5832007).

Y a todas y cada una de las personas que no nombre, que conocí en el transcurso del proceso y que me colaboraron en este camino brindándome siempre su apoyo y amabilidad.

Resumen

En el presente estudio se aisló, caracterizó y evaluó cepas de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas de *Apis mellifera*; las cepas fueron incorporadas como bacterias probióticas mediante fermentación *in vitro* en polen apícola para así lograr un potencial producto funcional. Se procesaron 38 muestras de pan de abejas en el medio de cultivo, Man Rogosa Sharpe (MRS), se realizó pruebas bioquímicas para su identificación. Entre las pruebas para evaluar la capacidad probiótica se determinó: tolerancia a pH ácido (3, 4 y 5), crecimiento en bilis (0.3, 0.5 y 1.0%), actividad hemolítica, actividad antibacteriana frente a cepas de referencia y sensibilidad a antibióticos; e identificación molecular. Se obtuvieron 11 aislamientos de *Lactobacillus sp* con una o más características probióticas, 4 de ellas resistente a pH bajos y a bilis, productoras de sustancias antimicrobianas, no productoras de hemolisinas y sensibles a antibióticos comunes como amoxicilina y eritromicina; en las fermentaciones con cepas autóctonas se obtuvo pan de abejas con comportamientos superiores para el índice de pH y acidez e inferiores en el recuento de células viables, en comparación con los resultados obtenidos con la cepa de referencia *Lactobacillus acidophilus*.

Palabras clave: *Lactobacillus sp*, probiótico, *Apis mellifera*, fermentación, pan de abejas, polen apícola.

Abstract

This study isolated, characterized and evaluated strains of *Lactobacillus sp* with probiotic potential from *Apis mellifera*'s bee bread; the strains were incorporated as probiotics bacteria through *in vitro* fermentation into bee pollen in order to achieve a potential functional product. Thirty-eight samples were processed in the culture medium Man Rogosa Sharpe (MRS); to the strains obtained were subjected biochemical tests for its identification. To assess the probiotic ability of the strains were determined some tests as: acid pH tolerance (3, 4 and 5), growth in bile (0.3, 0.5 and 1.0%), hemolytic activity, antibacterial activity against reference strains and sensitivity to antibiotics; and molecular identification. Once isolated of *Lactobacillus* were obtained with one or more probiotic characteristics, four showed resistance to low pH and to bile, with production of antimicrobial substances, not synthesizing hemolysins and sensitive to antibiotics commons as amoxicillin and erythromycin; in the fermentations with autochthons strains were obtained bee bread with behavior higher of pH and acidity and lower viable cell count in comparison with the results obtained from reference strain *Lactobacillus acidophilus*.

Keywords: *Lactobacillus sp*, probiotic, *Apis mellifera*, fermentation, bee bread, bee pollen.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas.....	XV
Lista de abreviaturas.....	XVI
Introducción	1
1. Objetivos.....	5
1.1 Objetivo general.....	5
1.2 Objetivos específicos.....	5
2. Marco teórico.....	7
2.1 El Polen.....	7
2.1.1 Clasificación del polen de <i>Apis mellifera</i>	7
2.1.2 Recolección y secado del polen	8
2.1.3 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del polen	8
2.1.4 Empleo del polen	10
2.2 Pan de abejas	10
2.2.1 Composición nutricional del pan de abejas	11
2.2.2 Propiedades del pan de abejas	11
2.2.3 Microorganismos en el pan de abejas	12
2.3 Aplicación microbiológica en alimentos	12
2.3.1 Origen de los microorganismos industriales.....	12
2.4 Probióticos	13
2.4.1 Evolución del término probiótico.....	13
2.4.2 Bacterias acidolácticas (BAL).....	14
2.4.3 El género <i>Lactobacillus</i>	17
2.4.4 Características de los probióticos	18
2.4.5 Mecanismos de acción de los probióticos	19
2.4.6 Aplicaciones clínicas de los probióticos	21
2.4.7 Requisitos de los alimentos probióticos	23
2.4.8 Presentación de probióticos	23
2.4.9 Riesgos de los probióticos en la práctica clínica	24

2.5	Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos	25
2.5.1	Pruebas <i>In vitro</i> para la selección de microorganismos probióticos.....	26
3.	Materiales y métodos	27
3.1	Localización del estudio	27
3.2	Obtención de muestras.....	27
3.3	Aislamiento y selección de cepas de <i>Lactobacillus sp</i>	27
3.4	Pruebas <i>In vitro</i> para potencial probiótico	28
3.4.1	Tolerancia a pH ácido.....	28
3.4.2	Crecimiento en bilis.....	28
3.4.3	Actividad hemolítica.....	28
3.4.4	Actividad antibacteriana	29
3.4.5	Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos	29
3.5	Identificación bioquímica y molecular de las cepas.....	30
3.5.1	Identificación bioquímica.....	30
3.5.2	Identificación molecular.....	31
3.6	Fermentación de polen	32
3.6.1	Preparación de los inóculos	32
3.6.2	Matriz de polen para la fermentación	33
3.6.3	Valoración de pH y acidez libre titulable	33
3.6.4	Recuento celular de las BAL	33
3.6.5	Evaluación sensorial.....	34
3.7	Análisis Estadístico	34
4.	Resultados	35
4.1	Aislamiento y selección de cepas de <i>Lactobacillus sp</i>	35
4.1.1	Aislamiento y selección de aislados por características microscópicas y macroscópicas.....	35
4.1.2	Selección por pruebas bioquímicas (Catalasa y Oxidasa)	37
4.2	Pruebas <i>In vitro</i> para potencial probiótico	38
4.2.1	Tolerancia a pH ácido.....	38
4.2.2	Crecimiento en bilis.....	38
4.2.3	Actividad hemolítica.....	38
4.2.4	Actividad antibacteriana	41
4.2.5	Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos	42
4.3	Identificación bioquímica y molecular de las cepas.....	43
4.3.1	Identificación bioquímica.....	43
4.3.2	Identificación molecular.....	44
4.4	Fermentación de polen	45
4.4.1	Medición de pH.....	45
4.4.2	Medición de la acidez libre titulable	46
4.4.3	Recuento celular de las BAL	46
4.4.4	Evaluación sensorial.....	47
5.	Discusión.....	49
5.1	Aislamiento y selección de cepas de <i>Lactobacillus sp</i>	49
5.2	Pruebas <i>In vitro</i> para potencial probiótico	50
5.2.1	Tolerancia a pH ácido.....	50
5.2.2	Crecimiento en bilis.....	51

5.2.3	Actividad hemolítica.....	51
5.2.4	Actividad antibacteriana	52
5.2.5	Susceptibilidad a los antibióticos	53
5.3	Identificación bioquímica y molecular de las cepas.....	53
5.3.1	Identificación bioquímica	53
5.3.2	Identificación molecular.....	54
5.4	Fermentación de polen	56
5.4.1	Comportamiento del pH y la acidez	56
5.4.2	Recuento celular de las BAL	57
5.4.3	Evaluación sensorial	57
6.	Conclusiones y recomendaciones	59
6.1	Conclusiones	59
6.2	Recomendaciones	61
A.	Anexo: Procedimiento para realizar recuentos	63
B.	Anexo: Procedimiento Actividad antibacteriana	65
C.	Anexo: Cuantificación de microorganismos por el método de Miles y Misra	67
D.	Anexo: Extracción de ADN	69
E.	Anexo: Identificación molecular	71
F.	Anexo: Ficha técnica del cultivo liofilizado comercial <i>Lb acidophilus</i> Danisco®	77
G.	Anexo: Estadística	79
	Bibliografía	83

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Pan de abejas.	10
Figura 2-2: Árbol filogenético de las BAL [55].	14
Figura 2-3: Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas [74].	16
Figura 2-4: Mecanismos de actividad probiótica [30, 37].	19
Figura 2-5: Modulación de células inmunitarias en el intestino por probióticos [125].	20
Figura 2-6: Formato de los productos probióticos comercializados [31].	24
Figura 2-7: Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos FAO/OMS [96]. ..	25
Figura 4-1: Porcentaje % de microorganismos según el Gram en el pan de abejas.	35
Figura 4-2: Características microscópicas del género <i>Lactobacillus</i>	37
Figura 4-3: Características macroscópicas del género <i>Lactobacillus</i>	37
Figura 4-4: Actividad antimicrobiana sobre el <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	41
Figura 4-5: Prueba de susceptibilidad a los antibióticos.	43
Figura 4-6: Sistema API®50 CHL.	43
Figura 4-7: Electroforesis de productos de PCR de los aislados.	44
Figura 4-8: Comportamiento del pH para cada cepa en los ensayos de fermentación.	45
Figura 4-9: Comportamiento de la acidez para cada cepa durante la fermentación.	46
Figura 4-10: Dinámica poblacional durante la fermentación de las cepas 6, 7, 10, 11, Cp.	47
Figura 4-11: Pan de abejas <i>in vitro</i>	48

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Evaluación sensorial y físico-química de cuatro especies de polen [134].	9
Tabla 2-2: Características Físico-químicas del polen y del pan de abejas en Colombia [35].	9
Tabla 2-3: Especies de <i>Lactobacillus</i> aislados del Tracto Gastrointestinal usados como Probióticos [12, 46, 132].	17
Tabla 2-4: Efectos de los probióticos en la práctica clínica [37].	21
Tabla 2-5: Criterios para evaluar el riesgo de sepsis por probióticos en la práctica Clínica [37].	24
Tabla 3-1: Discos comerciales empleados Oxoid®.	30
Tabla 4-1: Identificación microscópica por Gram de las colonias obtenidas.	36
Tabla 4-2: Resultados de Tolerancia a pH ácido.	39
Tabla 4-3: Resultados de Crecimiento en bilis.	40
Tabla 4-4: Crecimiento y tipo de hemólisis presentado por los once aislados.	38
Tabla 4-5: Resultados de Actividad antibacteriana.	41
Tabla 4-6: Resultados de sensibilidad a antibióticos.	42
Tabla 4-7: Resultados obtenidos en el programa informático de identificación <i>apiweb</i> ™.	44
Tabla 4-8: Resultados de la evaluación sensorial.	47
Tabla 5-1: Patrones de fermentación de carbohidratos sistema API®50 CHL	55

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AOAC	Association of Analytical Communities
ATCC	(American Tipe Culture Collection): Colección americana de Cultivos tipo
ATP	Adenosin Trifosfato
BAL	Bacterias Acidolácticas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DO	Densidad Óptica
EMP	Embden Meyerhof Parnas
ETA	Enfermedad Transmitida por Alimentos
FAO	(Food and Agriculture Organization of the United Nations): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GRAS	(Generally recognized as safe): Generalmente reconocida como segura
HDL	Colesterol de alta densidad
IEC	Células Epiteliales Intestinales
IFN	Interferón
Ig	Immunoglobulina
LDL	Colesterol de baja densidad
MRS	Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	(Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena polimerasa
TH1	Linfocitos T 1 ayudadores
TH2	Linfocitos T 2 ayudadores
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TSA	Agar Tripticasa de soya
UFC	Unidad Formadora de Colonias

Introducción

En Colombia la demanda de productos apícolas, como suplementos alimentarios, nutricionales y terapéuticos, ha permitido la generación de una cadena de comercialización que viene ganando mercados locales, regionales e internacionales, que demandan estudios de calidad y estabilidad, por parte de los consumidores.

A partir del adecuado manejo que se le puede dar a las abejas, se obtiene una variedad de productos para el uso y el consumo humano y para las propias abejas como fuente nutricional, a fin de mejorar su rendimiento productivo; entre los productos destinados al consumo humano alimenticio o terapéutico, están jalea real, miel, polen, propóleos, apitoxina, cera y pan de abejas [85, 91].

La apicultura en Colombia es considerada como una actividad importante, por constituir un recurso productivo y una forma de vida que permite la conservación de la diversidad biológica, las abejas participan como actores principales en la polinización de las plantas garantizando de esta manera la presencia de futuras generaciones en la vegetación, obteniendo a través de esta alimentos y productos, conocidos por los innumerables beneficios nutricionales y medicinales en los consumidores [13, 16, 115].

Esta actividad se lleva a cabo principalmente en algunas regiones de Colombia como Magdalena, Santander, Boyacá, Cauca, Meta, Quindío, Huila, Tolima, Sucre, Antioquía, Cundinamarca, lugares en donde la producción y la comercialización de los productos apícolas está condicionada al conocimiento y a la tecnología que posea el apicultor, lo que hace deseable que se incremente la investigación en torno a este tema con el fin de aumentar el aprovechamiento de los productos de la colmena, como también dar origen al desarrollo de productos de valor agregado que cumplan con criterios de calidad.

En nuestro país la actividad apícola está orientada principalmente en la producción de miel, en segundo lugar a la de polen, en menor proporción a la de jalea real, cera, propóleos, apitoxina y casi nula en pan de abejas, siendo este uno de los productos de la colmena más desaprovechados actualmente [84, 85].

El pan de abejas es un producto de la colmena, obtenido a partir de la fermentación microbiana sucedida en el polen corbicular, que posee múltiples beneficios en el consumo humano y animal, al constituirse como el alimento básico en el desarrollo de las larvas de las abejas, ostenta de innumerables cualidades nutricionales aportadas por su alto contenido de aminoácidos, vitaminas, minerales, fácilmente asimilables y digeribles [25, 45, 115].

Apis mellifera, requiere de ciertos compuestos nutricionales, obtenidos del polen necesarios para su funcionamiento vital y para la fabricación y secreción de otros productos, siendo asimilados únicamente después de una serie de procesos bioquímicos sucedidos en el interior de una celda; producto de una fermentación ácido láctica desarrollada por bacterias y por levaduras [44].

En los humanos, se hace aprovechable los nutrientes por ser más fáciles de absorber, además la combinación de diversas sustancias biológicamente activas, lo hace eficaz en la prevención y en el tratamiento de distintas enfermedades [25].

Este tipo de producto contiene aproximadamente seis veces más la cantidad de ácido láctico comparado con el polen fresco, ventaja que le provee mayor preservación y conservación de los nutrientes que se encuentran disponibles [43].

Este alimento al proveer múltiples beneficios en el consumidor se constituye como un potencial alimento funcional, alimentos que de acuerdo a la necesidad actual deben hacer parte de la alimentación diaria.

El consumo de alimentos funcionales se ha incrementado en los últimos años, debido al beneficio para la salud de los consumidores y en la productividad de los animales, debido a esto ha acrecentado el interés surgido en la actualidad, por la investigación orientada al avance en la producción de alimentos inocuos, con contenido nutricional, de poco aporte calórico y saludable, lo que ha generado el desarrollo de una variedad de productos, a partir de microorganismos intestinales tales como las bacterias acidolácticas y las bifidobacterias.

El ser humano y los animales en vista de su necesidad de sobrevivencia deben hacer uso de requerimientos nutricionales de los alimentos, incluyendo el agua, siendo estos la fuente constructora, reguladora y energética, para el desempeño adecuado de las funciones vitales del organismo; no obstante, estos también pueden ser el origen de un sin número de afecciones por exceso o por defecto y de enfermedades, afectando directamente la salud [27].

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), son un problema mundial de gran magnitud, por las consecuencias políticas, económicas y sanitarias que generan [95]. La falta de implementación de programas de vigilancia y seguridad alimentaria como son las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), favorecen la aparición y el desarrollo de enfermedades microbianas, que desencadenan desde un trastorno gastrointestinal hasta un compromiso sistémico, presentándose con mayor frecuencia en países en vía de desarrollo, lugares donde el sistema de acueducto y alcantarillado es deficiente o lo que es peor inexistente, aumentando el consumo de agua no potable y una inadecuada manipulación de alimentos [33]. La OMS asegura que el 88 % de las enfermedades diarreicas son producto de un abastecimiento de agua insalubre y de un saneamiento e higiene deficiente [57].

El polen apícola comercial en ocasiones ha mostrado no cumplir con los criterios de calidad establecidos para los alimentos, ya que presenta elevados recuentos de microorganismos indicadores, como mesófilos, coliformes, mohos y levaduras generando un producto de riesgo para el consumo humano, siendo de esta manera un problema su comercialización entre países productores y países consumidores [24]. La inconveniencia principal radica en la salud pública, ya que el polen al ser un alimento de ingesta cruda, facilita la incorporación de poblaciones

microbianas que afectan el equilibrio de la flora residente benéfica, predisponiendo el organismo a patologías del tracto gastro intestinal.

El Tracto gastrointestinal inferior, normalmente está poblado de comunidades bacterianas, que no generan ningún tipo de reacción adversa a su huésped, se encuentra colonizado por microorganismos, ya desde el nacimiento y durante toda la existencia del organismo anfitrión. Aunque la ingestión de agua y nutrientes supone cada día una oportunidad de colonización por nuevos microorganismos, la población microbiana permanece relativamente estable a no ser que se altere el equilibrio de la microflora como consecuencia de factores exógenos, como un tratamiento antibiótico [47, 81, 82, 92, 116, 128].

El uso de antibióticos facilita la proliferación de microorganismos resistentes a éstos fármacos, como *Enterococcus*, *Pseudomonas* y Hongos. *C. difficile* también prolifera con rapidez en esta situación, originando desde una diarrea hasta una colitis pseudomembranosa [92].

La exposición a otros microorganismos patógenos intestinales, como *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella sp*, pueden alterar la microflora del colon, ocasionando inflamaciones e infecciones de tipo agudo, las cuales al no ser tratadas eficientemente podrían causar la muerte [29, 110, 116].

Las infecciones intestinales, han sido un punto de estudio destinado a encontrar posibles soluciones, que mitiguen total o parcialmente este tipo de afecciones, debido a esto y al no existir un adecuado sistema de vigilancia y control sanitario, ha tomado importancia el tema de Inocuidad en los Alimentos, se conoce que se puede reducir la presencia de microorganismos indeseables al aumentar los microorganismos deseables en los Alimentos Funcionales, incluyendo el uso de microorganismos probióticos, que han adquirido importancia en los últimos años debido a que se les atribuye beneficios a la salud en la prevención y el tratamiento de enfermedades [89].

Se han estudiado poblaciones bacterianas, que pueden actuar como antagonistas de microorganismos oportunistas y de patógenos, a través de diferentes funciones propias de las especies implicadas en dichas investigaciones. Las cepas microbianas utilizadas en la producción de probióticos, en su mayoría son de origen animal, aisladas del tracto Gastrointestinal [98].

El riesgo de infección por productos probióticos Lactobacilos o Bifidobacterias es similar a una infección por bacterias comensales, sin implicación para consumidores sanos, sin embargo lo podría ser para pacientes inmunocomprometidos [97]. El desarrollo de probióticos, requiere una adecuada selección de cepas, debido a que solo unas pocas especies de bacterias ácidolácticas tienen efectos positivos en la salud. Los microorganismos deben ser identificados mediante pruebas que deben ser realizadas en cepas individuales, según estudios previos de evaluación, se atribuyen efectos diferentes entre diversas especies [119].

Entre otras propiedades, las bacterias ácidolácticas producen varios tipos de metabolitos, como ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas que impiden el crecimiento de patógenos, modifican enzimáticamente receptores de toxinas e impiden la colonización de los patógenos, por inhibición competitiva [54].

También se utilizan frente a casos de intolerancia a la lactosa, enfermedades crónicas como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, gastroenteritis aguda, alergias y cáncer de colon [41], lo

que hace de este tipo de bacterias una alternativa prometedora para la prevención de desórdenes intestinales [30].

Es precisamente debido a este tipo de microorganismos, patógenos y oportunistas, que surgió la idea de investigar a fondo como contrarrestar la acción de estos, haciendo uso de los microorganismos residentes en el tracto gastrointestinal benéficos, utilizándolos como terapia preventiva frente a infecciones que comprometen el Sistema Digestivo [54].

Investigaciones previas han revelado que, los microorganismos aislados en el pan de abejas han pertenecido a los géneros, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Eschericia*, y *Bacillus*; levaduras tipo *Sacharomyces* dentro de las más importantes [43].

De todos estos, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, son los encargados de la fermentación láctica [43], en donde para efectos de este estudio, el género *Lactobacillus* se constituyó en bacterias a caracterizar y evaluar su potencial como probióticos, mediante pruebas como tolerancia a pH ácido, crecimiento en bilis, actividad hemolítica, actividad antibacteriana, sensibilidad a antibióticos y fueron identificadas molecularmente; las mejores cepas que cumplieron los anteriores parámetros fueron probadas en procesos fermentativos en sustratos de polen apícola, con el objetivo de lograr un acercamiento a obtener un alimento funcional tipo pan de abejas industrial.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el potencial probiótico del aislamiento de Lactobacilos obtenidos a partir de Pan de abejas y valorar su posible aplicación en la fermentación *in vitro* de polen apícola.

1.2 Objetivos específicos

Aislar y Caracterizar Lactobacilos de Pan de abejas de *Apis mellifera*.

Evaluar el Potencial Probiótico del aislamiento de Lactobacilos *in vitro*.

Comparar el comportamiento de propagación y sostenibilidad de los Lactobacilos aislados, versus una cepa comercial de *Lactobacillus acidophilus* reconocida como probiótica, en el sustrato natural polen apícola, bajo condiciones de posible aplicación industrial.

2. Marco teórico

2.1 El polen

Se define como el elemento germinal masculino, producido en los sacos polínicos de la antera de la flor, indispensable para la fecundación y consiguiente transformación de la flor en fruto; desde el punto de vista morfológico, los granos miden aproximadamente de 20 a 40 micrones, con forma esférica u ovalada, están compuestos por una célula viviente rodeada de una membrana gruesa llamada esporodermis [113].

La esporodermis está constituida por dos cubiertas concéntricas, en la parte interna es denominada intina, su principal componente es la celulosa, quien le confiere elasticidad y en la parte externa la exina, pared gruesa conformada por la esporopolenina, quien le confiere resistencia a la desecación y por lo tanto impide la muerte de la célula [39, 113].

Su aspecto y propiedades sensoriales de color, sabor, aroma, textura y tamaño están en función de su origen botánico.

En cuanto al Color, las tonalidades van desde el verde al naranja y desde el amarillo al marrón, en algunos casos se pueden observar pólenes violáceos y café oscuro; al degustarlo se presentan sabores intensamente dulzainos o ligeramente amargos con tonos astringentes; el aroma: esta proporcionado por la flor; desde el punto de vista de la producción, la mejor zona es aquella que no depende de una floración única, sino de varias ofertas de néctar y polen capaces de proporcionar recursos abundantes que superen las necesidades de la colonia [38].

El polen es fundamental en la alimentación de las larvas que van a originar las futuras obreras y en menor medida a los zánganos, una colonia no puede criar larvas si no tiene polen, es la única fuente de proteínas para la colmena, es el principal aporte de vitaminas A, B, K y E, además de fósforo, cloruros, flúor, potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro y manganeso entre otros [25, 39, 90].

2.1.1 Clasificación del polen de *Apis mellifera*

- Polen corbicular: Corresponde al material colectado por las abejas y transportado en sus patas a la colmena.
- Polen apícola: Es el polen capturado mediante trampas por los apicultores, que luego es removido, seleccionado y sometido a un proceso de secado para reducir su actividad de agua e incrementar su vida útil para su comercialización.

- Polen Alveolar: También llamado Pan de abejas, está dispuesto en las celdas de los panales para su maduración.

Estos tipos de pólenes presentan diferencias fisicoquímicas y nutricionales.

2.1.2 Recolección y secado del polen

El procedimiento se efectúa por medio de trampas situadas en la piquera o en el piso de la colmena, que contienen orificios que al ser atravesados por las obreras hacen que los granos de polen corbicular rocen con los bordes de las perforaciones ocasionando su caída para la colecta, es indispensable el vaciado diario de los cajones con la cosecha, ya que al permanecer húmedo el polen fermenta rápidamente [2, 99].

Para la deshidratación del polen es necesario el uso del secador, el cual consta de una serie de bandejas, en una cámara ventilada, donde es extendido el polen y sometido a temperaturas inferiores a los 48°C por espacio de 3 ó 4 h, en el proceso de secado se reduce su contenido de humedad desde un 12 % hasta un 5.6 %. Posteriormente, al polen le es retirado las impurezas (patas, alas, antenas) utilizando ventiladores; finalmente se empaqueta el vacío o con el mínimo de aire posible, con el fin de asegurar al máximo su conservación y sus propiedades nutricionales [2, 25, 99].

2.1.3 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del polen

El polen fresco es de carácter ácido, posee una textura blanda que se altera en el proceso de deshidratación pasando a ser ligeramente duro. En la Tabla 2-1, se pueden observar algunas propiedades del polen, evaluadas por [134].

La fracción proteica del polen le confiere un alto valor biológico por el alto contenido de aminoácidos esenciales, sumado al contenido de minerales (zinc, hierro, cobre, sodio, potasio, calcio, magnesio y fósforo), fibra y la reducida fracción grasa con presencia de omegas, haciendo de este producto un alimento funcional. En la Tabla 2-2 se pueden observar algunas propiedades físico-químicas del polen colombiano [35].

La calidad microbiológica del polen está en función de la humedad relativa, un valor alto contribuye a su deterioro en algunos casos con la presencia de hongos toxigénicos que producen aflatoxinas, como también, es frecuente encontrar poblaciones microbianas que atentan contra la calidad higiénica de estos productos relacionándose las Enterobacterias, principalmente [9].

Tabla 2.1: Evaluación sensorial y físico-química de cuatro especies de polen [134].

Parámetros	Tipos de polen			
	<i>Brassica napus</i>	<i>Fraxinus americana</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Datura arborea</i>
SENSORIALES				
Color	amarillo	anaranjado	pardo	cremoso
Olor	resina	paja	paja	miel
Sabor	ácido, amargo	dulce	dulce, ácido	ácido, astringente
Textura	pegajoso	pegajoso	crujiente	polvoroso
FÍSICOQUÍMICOS				
Humedad (g agua/100 g polen)	9,05 ± 1,05	9,29 ± 0,98	9,90 ± 1,12	8,74 ± 0,63
Cenizas (g cenizas/100 g polen)	2,75 ± 0,12	2,55 ± 0,17	2,15 ± 0,10	3,39 ± 0,08
Extracto etéreo g grasa/100 g polen	3,36 ± 0,24	3,27 ± 0,32	2,49 ± 0,16	2,00 ± 0,15
Proteínas g proteína/100 g polen	19,92 ± 2,10	20,31 ± 2,22	16,54 ± 2,26	26,30 ± 2,89

Tabla 2.2: Características Físico-químicas del polen y del pan de abejas en Colombia [35].

Característica	Polen seco		Polen húmedo		Pan de abejas	
	BH	BS	BH	BS	BH	BS
Humedad (g/100g)	5,57	-	19,90	-	18,44	-
Aw	0,27	-	0,72	-	-	-
pH	4,636	-	4,830	-	4,132	-
Acidez libre (meq/kg)	234,99	248,84	189,38	236,78	271,18	332,47
Grasa (g/100g)	5,80	6,14	5,36	6,69	5,45	6,69
Proteína (g/100g)	22,5	23,8	16,3	20,4	17,1	21,0
Fibra cruda (g/100g)	7,2	7,6	8,6	6,90	12,4	13,1
Fibra dietaria (g/100g)	14,4	15	9,9	12,3	-	-
<i>Fibra dietaria soluble</i>	1,3	1,4	1,9	2,3	-	-
<i>Fibra dietaria insoluble</i>	13,1	13,9	8,0	10,0	-	-
Azúcares (g/100g)						
<i>Fructosa</i>	19,21	20,34	15,65	19,53	9,74	11,94
<i>Glucosa</i>	11,94	12,64	16,23	20,27	10,59	12,86
<i>Sacarosa</i>	8,52	9,02	4,42	5,52	10,18	12,48
Cenizas (g/100g)	2,33	2,47	1,59	1,99	1,81	2,22
Minerales (mg/kg)						
<i>Calcio</i>	1695,7	1795,7	1358,8	1696,4	-	-
<i>Magnesio</i>	2273,3	2407,3	1471,7	1873,3	-	-
<i>Zinc</i>	32,7	34,6	24,0	30,0	-	-
EC ₅₀ para DPPH (mg/ml)	0,455	0,430	0,661	0,529	0,406	0,331
Digestibilidad en pepsina**	72,2	-	91,7	-	-	-

* BH: base húmeda y BS: base seca

** Expresada en % de la proteína digerible respecto a la proteína total

*.-No fue medido

2.1.4 Empleo del polen

El polen se ha utilizado por sus múltiples acciones en alimentación, cosmetología y terapéutica:

- Suplemento mineral, indicado a cualquier edad, en personas hipertensas gracias a la relación Sodio/Potasio.
- Suplemento Proteínico.
- Regulación del equilibrio orgánico y estimulación del crecimiento.
- Regulación de las funciones intestinales y del sistema nervioso.
- Resistencia a infecciones.
- Previene la obesidad [38, 91].

2.2 Pan de abejas

La abeja *Apis mellifera* requiere de ciertos compuestos nutricionales, agua, carbohidratos, obtenidos a partir del néctar, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales; obtenidos partir del polen, necesarios para su funcionamiento vital. El polen no es consumido directamente por las abejas, la producción del alimento está ligado al almacenamiento de los granos por la abeja en la celda, la obrera que regresa del campo los deposita en el alvéolo, al momento otra abeja, usualmente una de casa o una abeja joven, llega a la celda y examina su contenido, al encontrar los granos libres, empieza a trabajar en la base de la celda con un activo movimiento de la cabeza y con las mandíbulas cerradas. Cuando los granos alcanzan la base de la celda, donde hay polen guardado, estos son perforados e incorporados dentro de la masa, y el conjunto es pulido con las mandíbulas y la lengua [38]. En el interior las secreciones salivares (con alto contenido enzimático y microbiano) [56] y el néctar le son agregados, mientras las celdas son operculadas con una delgada capa de miel [43], generándose internamente un ambiente anaeróbico con una temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, lo que desarrolla en el polen una serie de reacciones bioquímicas, originados por una fermentación ácido láctica producida por bacterias y por levaduras [43, 45], dando origen al Pan de Abejas Figura 2-1.

Figura 2-1: Pan de abejas.



Chevtchik (1950) En estudios previos realizados sobre la fermentación del polen a pan de abejas, observó que el proceso se llevaba a cabo en cuatro etapas a lo largo de siete días, la primera etapa dura aproximadamente 12 horas, caracterizada por la presencia de un grupo variado de microorganismos como bacterias lácticas, aerobias y levaduras; en la segunda etapa surgen las bacterias anaerobias, que utilizan factores de crecimiento sintetizados por levaduras y bacterias, ocasionando un descenso en el pH del polen e incrementando el contenido de vitamina B; en la tercera etapa, comienzan a desaparecer los microorganismos incapaces de tolerar el pH, incrementándose las bacterias lácticas tipo *Lactobacillus*, favoreciendo una mayor producción de ácido láctico, la última etapa empieza el séptimo día, con un pH de alrededor de 4 – 4.2, destacándose la reducción del contenido microbiano, permaneciendo únicamente algunos microorganismos resistentes a condiciones adversas, bacterias lácticas y levaduras.

2.2.1 Composición nutricional del pan de abejas

El pan de abejas contiene proteínas de alto valor biológico, encontrándose disponibles como aminoácidos esenciales con una mayor facilidad de absorción, contiene vitaminas, como B1, B2, C, E, K, entre otras, pigmentos como carotenoides y antocianinas; enzimas como la sacarasa, amilasa y fosfatasa, más de 25 minerales entre los que se destacan, hierro, calcio, magnesio, fósforo, potasio, cobre, zinc y selenio [7, 11, 93, 100].

La cantidad de ácido láctico generado (aproximadamente seis veces mayor que en el polen), provee funciones de conservación y preservación del producto, por mucho tiempo, además conserva los nutrientes provenientes del polen, siendo más digerible y apetecido por las abejas adultas para la fabricación y secreción de otros productos [93].

2.2.2 Propiedades del pan de abejas

En las abejas la falta de proteínas por escasez de pan de abejas en los primeros 10 días de vida se puede ver reflejado en el desarrollo inadecuado de las glándulas hipo faríngeas, encargadas de la secreción de la Jalea Real, de igual manera cuando se acaban las reservas para mantener la cría, se recurre a las proteínas del intestino y del musculo, originando abejas más pequeñas con problemas intestinales, con deficiencias hormonales e inmunitarias, además afecta la recolección del polen [48].

En el ser humano, la combinación de diversas sustancias biológicamente activas, lo hace eficaz en la prevención y el tratamiento de numerosas enfermedades como, gastritis, úlceras, colitis, constipación crónica, diarreas, hepatitis, anemia, alergias, infartos, disminuye los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, reduce la presión arterial, y desempeña un papel importante en la alimentación dietética. [7, 93].

Posee actividad antiséptica conocida frente a varias especies patógenas de los géneros *Staphylococcus* y *Escherichia*.

2.2.3 Microorganismos en el pan de abejas

Los microorganismos aislados en el pan de abejas corresponden a levaduras destacándose *Sacharomyces* y a especies bacterianas de los géneros, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*, estas dos últimos pertenecientes a las bacterias acidolácticas y encargadas directamente de la producción de ácido láctico [43].

La *Apis mellifera* ha hecho uso de los procesos de fermentación para la obtención de su alimento preservándolo por más tiempo haciéndolo biodisponible.

2.3 Aplicación microbiológica en alimentos

En la actualidad hay un considerable interés por el aumento de la cantidad y actividad de la flora del colon, con el fin de promover la salud en los humanos y en las especies animales, de esta manera se han determinado diferentes estrategias para modificar el contenido microbiano, como la inclusión en los alimentos de bacterias utilizadas como probióticos, de carbohidratos no digeribles utilizados como prebióticos y la suma de probióticos y prebióticos originando un alimento de carácter simbiótico [127, 135].

Los probióticos pueden ser considerados como “ingredientes funcionales” que son utilizados para “funcionalizar” alimentos, es decir agregar una propiedad definida que le otorga un valor agregado al producto, ya que entregan beneficios para la salud del consumidor, más allá de los beneficios nutricionales del alimento que los contiene [15]. Además que su utilización como estimuladores del crecimiento animal constituye una alternativa satisfactoria para la sustitución de antibióticos.

Algunas de las cepas microbianas usadas como probióticos, son de origen gastrointestinal humano o animal [40], presentando cada una distintas propiedades, de manera que una cepa específica ejerce solo algunas de todas las características que describen a los probióticos. [35]

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han declarado que hay evidencia científica para indicar el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios en la salud y de las cepas específicas que son seguras para uso humano [96].

2.3.1 Origen de los microorganismos industriales

Han sido escogidos a partir de fuentes naturales bajo criterios establecidos como:

- Selección *in vitro* de aquellas cepas que presentan características benéficas para el huésped.
- Cepas sintetizadoras de enzimas de uso en alimentos.
- Cepas con características probióticas.
- Provenientes de fuentes reconocidas como colecciones de cultivo públicas y privadas [72].

2.4 Probióticos

2.4.1 Evolución del término probiótico

El científico Elie Metchnikoff en el año 1907, evidenció beneficios en el proceso de fermentación de la leche, tras notar que los lactobacilos convertían la lactosa en ácido láctico, por ende la acidez generada creaba un ambiente hostil para las bacterias patógenas. De esta manera, defendió la importancia de la dieta en la salud, tras proveer protección frente a patógenos y así mejorar la calidad de vida [34, 79, 96].

El médico pediatra francés Henry Tissier, destacó la importancia de las bifidobacterias, al notar la baja cantidad en niños con episodios diarreicos, no así en niños sanos, en quienes encontraba una cantidad significativa, con esta investigación postuló que la administración de bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal [34, 96].

Lilly y Stilwell en 1965, introdujeron por primera vez el término “probiótico” refiriendo que son “Sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro” [34].

Parker en 1974 definió a los probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal” [34].

Fuller en 1989 postuló a los probióticos como “suplementos microbianos que influyen beneficiosamente en el huésped animal mejorando su balance microbiano” [34].

Salminen en 1998 posteriormente, conceptualizó a los probióticos como “Alimentos que contienen bacterias vivas las cuales son beneficiosas para la salud” [34, 79].

Con la consecuente investigación en torno al tema y teniendo en cuenta los postulados y las definiciones anteriormente enunciadas, se ha ampliado y actualizado el concepto que se tiene de probióticos, como un producto que contiene un número suficiente de microorganismos vivos, puros o mixtos, con un efecto beneficioso sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microbiota por colonización del intestino [69, 118, 130].

Finalmente según la FAO/OMS se define como “Organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped”.

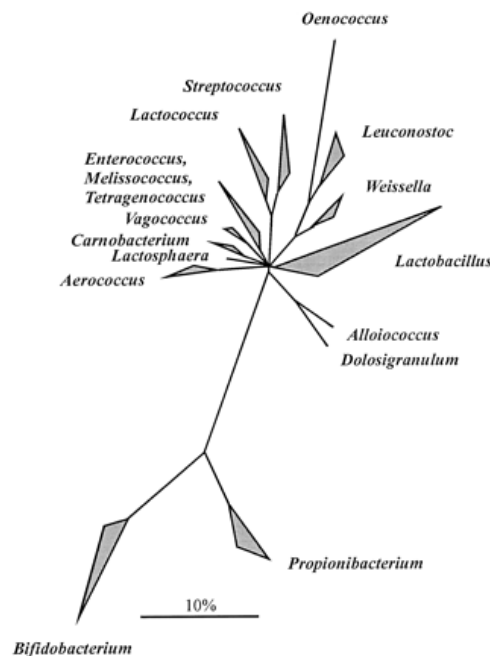
Los microorganismos empleados como probióticos, son hongos y/o bacterias comensales que forman parte de la flora gastrointestinal, vaginal y de la boca, se citan los siguientes géneros entre las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *boulardii* y entre las bacterias *Bacillus*, bacterias acidolácticas destacándose el *Bifidobacterium* y para efectos del presente estudio el *Lactobacillus*.” [79, 108].

2.4.2 Bacterias acidolácticas (BAL)

Las BAL son generalmente reconocidas como GRAS (Generally recognized as safe) con importancia en la preservación y en la fermentación de alimentos, mejorando la calidad higiénica e inhibiendo la presencia de patógenos [59, 111].

Los diversos géneros de las BAL, se han definido sobre la morfología celular, ADN y tipo de fermentación. La relación filogenética se basa en la comparación de secuencias de ARNr 16S, con un % molar guanina-citosina bajo en el ADN, mostrando a *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y el recientemente descrito *Lactosphaera* como los géneros más cercanos, *Lactococcus* y *Streptococcus* relativamente cercanos, mientras que *Lactobacillus* es más diverso y los géneros no relacionados *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* Figura 2-2 [46, 55].

Figura 2-2: Árbol filogenético de las BAL [55].



Son bacilos o cocos Gram positivos que como producto de fermentación originan ácido láctico, carecen de porfirinas y de citocromos, no obtienen energía por fosforilación oxidativa por transporte de electrones, sino por fosforilación a través del sustrato en ambientes ricos en azúcares, tienen metabolismo biosintético limitado a medios de cultivo con aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas [21, 105].

Todas crecen en condiciones anaerobias, no obstante pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, por eso son consideradas como anaerobias aerotolerantes, algunas cepas pueden utilizar O_2 con la mediación de sistemas de flavoproteína oxidasa produciendo H_2O_2 , eliminando este último por intermedio de peroxidasa [21, 105].

Entre los subgrupos de las bacterias acidolácticas se generan dos tipos de fermentaciones de acuerdo a los productos obtenidos:

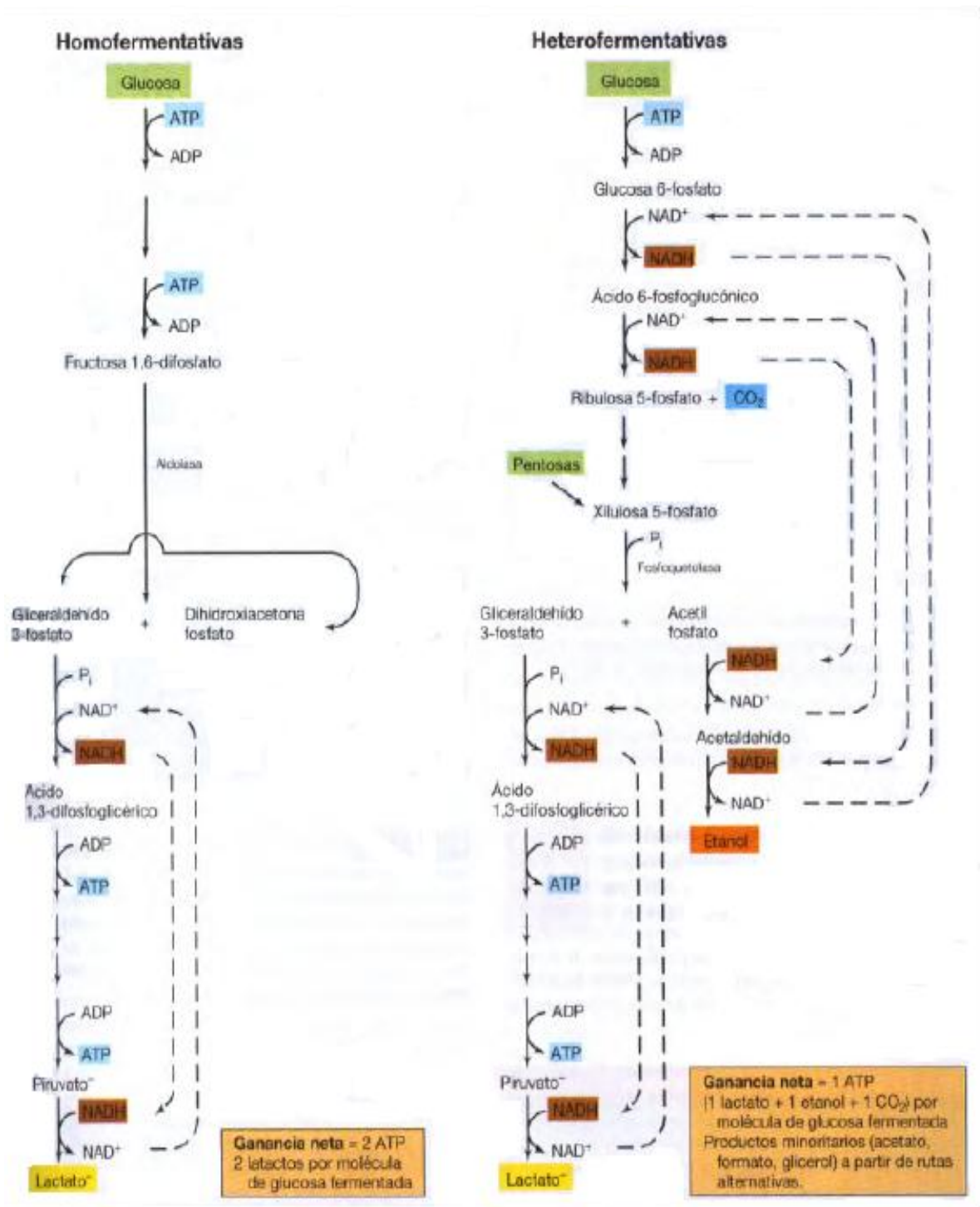
- Grupo homofermentativo: produce solamente ácido láctico.
- Grupo heterofermentativo: produce además de ácido láctico, etanol y CO₂.

En la Figura 2-3, se observan las rutas de fermentación de la glucosa por organismos homo y heterofermentativos, la diferencia está determinada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, los heterofermentativos carecen de esta enzima y no pueden fragmentar la fructosa difosfato, que origina ácido láctico, en su lugar la glucosa 6 fosfato es oxidada hasta 6-fosfogluconato, que es descarboxilado hasta pentosa fosfato que escinde hasta triosa fosfato y acetil fosfato por acción de fosfoacetolasa, la triosa fosfato da origen al ácido láctico y una molécula de ATP, y el acetil fosfato da origen a etanol sin moléculas de ATP y la descarboxilación del 6-fosfogluconato produce CO₂ [74].

Existe poca variación de estirpe a estirpe por poseer una composición de bases de DNA muy parecida entre los miembros de los géneros, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. No presentándose la misma situación entre las especies de *Lactobacillus*, al poseer una composición de bases muy diversa, lo que lo hace un grupo heterogéneo [74].

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de bacterias ácidolácticas, deben conservar características ácidas, con los requerimientos nutritivos mencionados anteriormente y con un ambiente preferiblemente microaerófilico; el medio de cultivo de elección para su crecimiento es el Man Rogosa Sharpe (MRS), selectivo para bacterias acidolácticas, incluyendo, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [22].

Figura 2-3: Fermentación de la glucosa en bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas [74].



2.4.3 El género *Lactobacillus*

Son microorganismos Gram positivos, de morfología bacilar, en algunas especies algo flexionados, con longitud y grosor variado, no formadores de esporas, Inmóviles, catalasa negativos, no reductores de nitratos, citocromo negativos, no licuan la gelatina, su temperatura óptima de crecimiento es de 30-40°C; está ampliamente distribuido en la naturaleza, en productos de origen vegetal y en el tracto Gastrointestinal humano y animal y presentan metabolismo homofermentativo y heterofermentativo [9, 34, 74, 104, 105].

Actualmente existen 207 especies conocidas [70] y desde el punto de vista como probióticos comerciales tienen especial interés 26 especies que se observan en la Tabla 2-3. La comparación de las secuencias de genes ADN 16S de *Lactobacillus* muestran que las regiones V1, V2 y V3 contienen la información específica de las especies [132].

Tabla 2-3: Especies de *Lactobacillus* aislados del Tracto Gastrointestinal usados como probióticos [12, 46, 132].

Especies	Cepa comercialmente disponible
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA1; NCFM; LA5
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La1; DDS-1; SBT-2062; NCC533
<i>Lactobacillus paracasei</i>	F19
<i>Lactobacillus casei</i>	CRL-431; Immunitas; Shirota
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG; LB21; 271; GR-1; VTT E-97800
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v; Lp01
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>	Lb 12
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp lactis</i>	L1a
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	RC-14
<i>Lactobacillus reuteri</i>	MM2
<i>Lactobacillus brevis</i>	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	UCC118
<i>Lactobacillus helveticus</i>	B02
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LG21
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	
<i>Lactobacillus agilis</i>	
<i>Lactobacillus aviarius</i>	
<i>Lactobacillus murinus</i>	
<i>Lactobacillus hamsteri</i>	
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	
<i>Lactobacillus ruminis</i>	

Lactobacillus es el género con más especies acidolácticas clasificadas de acuerdo a sus propiedades fermentativas:

- Grupo A: Lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan hexosas a ácido láctico vía Embden Meyerhof Parnas (EMP), los microorganismos poseen la enzima fructosa 1,6 bifosfatoaldolasa y no la fosfoetolasa por lo que no fermentan pentosa ni gluconato. *L. delbruekii* y *L. acidophilus* [66, 136].
- Grupo B: Lactobacilos homofermentativos facultativos, fermentan hexosas hasta ácido láctico vía (EMP), fermentan pentosas y gluconato vía fosfogluconato hasta ácido láctico y ácido acético. *L. casei* y *L. plantarum* [66, 136].
- Grupo C: Lactobacilos heterofermentativos obligados, fermentan siempre las hexosas a ácido láctico, etanol, ácido acético y CO₂ vía fosfogluconato y fermentan las pentosas a ácido láctico y a ácido acético vía fosfogluconato. Cepas de *Lactobacillus* próximos a *Leuconostoc* [66, 136].

Los *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias acidolácticas, siendo capaces de crecer a pHs bajos de 4. Lo que facilita su aislamiento en medios que contengan ácidos y azúcares; esta resistencia les permite seguir creciendo, aun en pHs que hayan descendido tanto, en comparación con otras bacterias lácticas, siendo las únicas capaces de finalizar las fermentaciones lácticas [74].

2.4.4 Características de los probióticos

Según la FAO/OMS es deseable que los microorganismos probióticos posean características que intervengan en el control de patógenos intestinales tales como:

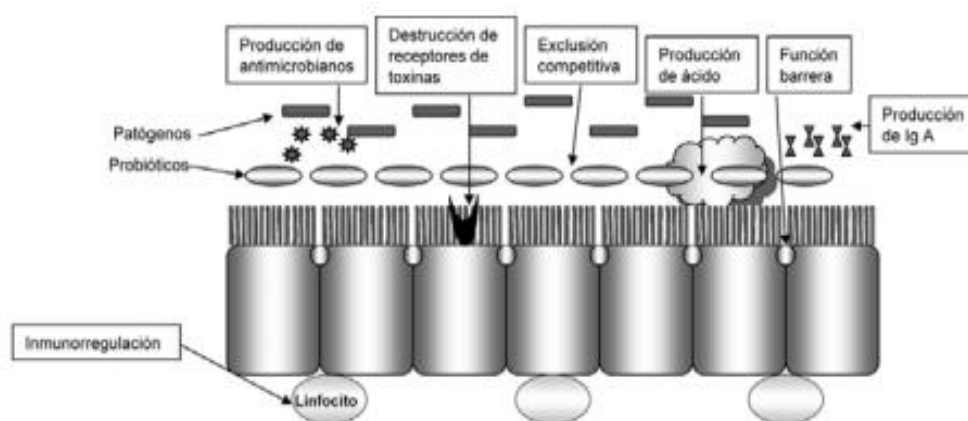
- Producción de sustancias antimicrobianas.
- Exclusión competitiva
- Competencia por los nutrientes
- Modulación del sistema inmunitario
- Resistencia a la acidez gástrica y biliar
- Capacidad de permanecer viables en el producto, desde el envasado, almacenamiento, hasta el consumo, conservando las características descritas en las etiquetas.
- Ser habitante normal del intestino humano [59, 69, 130, 138].
- Proporcionar seguridad a nivel clínico y alimentario (no ser patógeno ni toxigénico) [69, 106, 130, 138].

- Poder de adaptación a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente [59, 69, 130, 138].
- Proporcione deseables propiedades organolépticas [42, 69, 106, 130, 138].

2.4.5 Mecanismos de acción de los probióticos

Se han descrito múltiples mecanismos, Figura 2-4, destinados a mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos, a través de diferentes funciones:

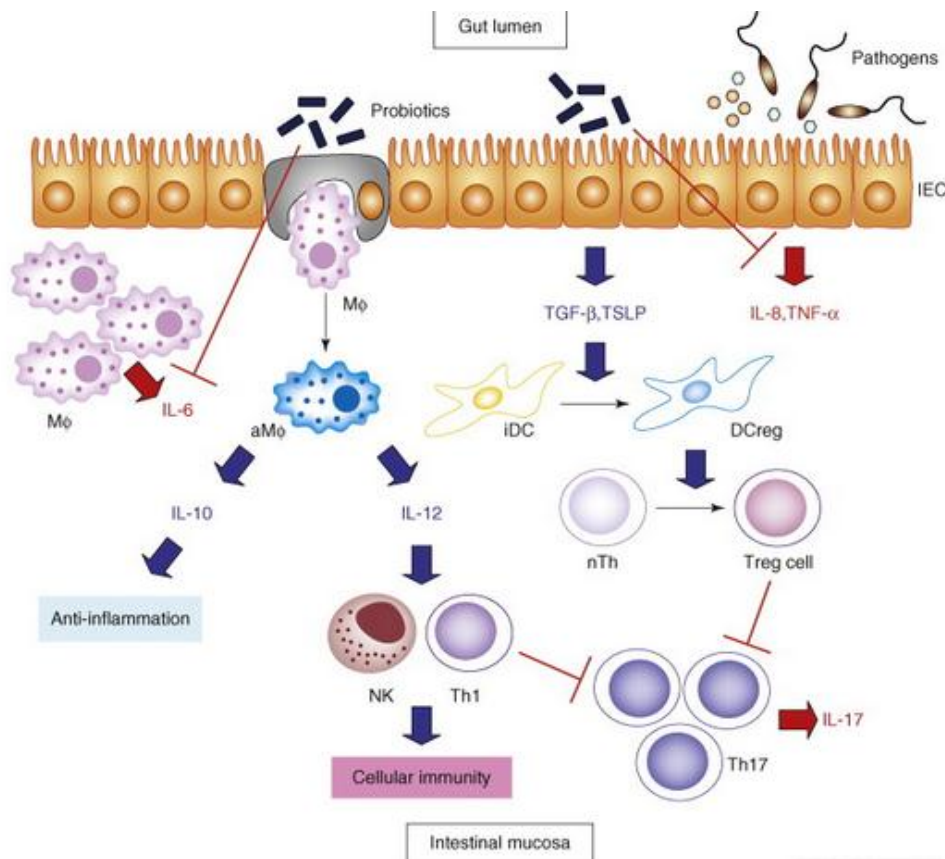
Figura 2-4: Mecanismos de actividad probiótica [30, 37].



- Efectos bioquímicos: Son logrados a través de la producción de sustancias antimicrobianas que reducen el número de células viables patógenas, afectan el metabolismo bacteriano, la producción de toxinas [112] y contribuyen a la prevención en la descomposición de los alimentos [30, 49, 111], a través de:
 - Metabolitos originados como producto final en cantidades variables como el ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y diacetilo [30, 34, 76].
 - En la disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de organismos beneficiosos.
 - Bacteriocinas, corresponden a proteínas o complejos de proteínas biológicamente activas de alto peso molecular, se dividen en cuatro clases, clase I: lantibióticas, termolábiles < 5 kDa, clase II: pequeñas, hidrofóbicas, termoestables, 13 kDa, clase III: termolábiles, 3 kDa y las clase IV (bacteriocinas complejas): se encuentran asociadas a lípidos o carbohidratos. La mayoría de las bacteriocinas que han sido aisladas de *Lactobacillus*, pertenecen a la clase II [30, 34, 49, 111].

- **Competición por nutrientes:** La capacidad para competir por nutrientes, es un factor determinante en la composición de la microflora intestinal, las especies bacterianas residentes en la porción proximal del colon tienen un gran suministro de nutrientes proporcionado por los residuos alimenticios provenientes del intestino delgado, no así existe la misma disponibilidad de nutrientes para las bacterias que habitan en la porción distal del colon, de esta manera la presencia de microorganismos probióticos reduce aún más, el sustrato disponible en los tramos del colon para otras especies bacterianas [27, 30, 34, 112].
- **Actividad Inmunomoduladora:** Estimula la inmunidad innata y adquirida, activando los mecanismos celulares y humorales a través de la producción de Inmunoglobulina A (IgA), activando la actividad fagocítica mediante el aumento de macrófagos e incrementando Interferón Gamma (IFN-gamma) y Citoquinas proinflamatorias, Figura 2-5 [30, 34, 58, 62, 107].

Figura 2-5: Modulación de células inmunitarias en el intestino por probióticos [125].



- **Adhesión celular:** Los probióticos deben tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, para de esta forma resistir la peristalsis y evitar ser expulsados. En adición, debido a su permanencia bloquean la invasión y la adhesión de enteropatógenos. Algunas cepas han sido escogidas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus spp* [34, 42, 59, 68, 87, 101, 112, 138].

2.4.6 Aplicaciones clínicas de los probióticos

De acuerdo a las cepas probióticas administradas, forma de adquisición, dosis y características inherentes al huésped, se observará un resultado beneficioso para la salud Tabla 2-4.

Tabla 2-4: Efectos de los probióticos en la práctica clínica [37].

<p>Efectos metabólicos</p> <p>Favorecen la absorción de agua y calcio</p> <p>Modulan el metabolismo lipídico</p> <p>Efecto masa: prevención y tratamiento del estreñimiento</p>
<p>Efectos protectores</p> <p>Prevención de infecciones intestinales (diarrea aguda, crónica, por antibióticos o asociada a <i>Clostridium difficile</i>)</p> <p>Prevención de infecciones sistémicas debido a la traslocación bacteriana (pacientes graves)</p> <p>Reducción de manifestaciones de atopia</p> <p>Prevención de infecciones vaginales y de parto prematuro</p> <p>Mejora de la esteatosis hepática</p> <p>Mejora de la encefalopatía hepática</p> <p>Mejora de la tasa de erradicación de <i>Helicobacter pylori</i></p>
<p>Efectos tróficos</p> <p>Prevención y control de la enfermedad inflamatoria intestinal</p> <p>Reducción del riesgo de cáncer colorrectal</p>

El uso de microorganismos probióticos se ha incrementado debido a los múltiples beneficios en salud que se han observado a través de sus aplicaciones en diferentes patologías [30, 37, 53, 88, 96]:

- **Tracto gastrointestinal**

La diarrea es un efecto secundario frecuente al uso de antibióticos, ocurre generalmente en pacientes que reciben antibioterapia de amplio espectro, los probióticos son una alternativa eficaz para reducir esta alteración, microorganismos como el *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus GG*, y otros como las bifidobacterias se han usado en la prevención y tratamiento de la diarrea y han demostrado la reducción de la intensidad y de la duración del cuadro clínico [79, 88].

Su uso también está indicado en casos de Colitis pseudomembranosa por *C. difficile*, diarreas asociadas con cepas de *E.coli* enteropatógenas y enterotoxigénicas, Rotavirus principalmente en niños, síndrome de colon irritable y enterocolitis necrotizante, [88].

Frente a casos de enfermedad inflamatoria intestinal, la cual es una patología asociada a la defectuosa regulación que hay entre la microflora bacteriana y la inmunidad de la mucosa intestinal sucediendo en pacientes genéticamente susceptibles; en esta enfermedad las bacterias probióticas actúan de diferentes formas, produciendo sustancias antimicrobianas, por

interacciones competitivas metabólicas e inhibiendo la adherencia de patógenos por la acción de factores de defensa inmune local [52, 79, 124].

En el problema de intolerancia a la lactosa, causada por una deficiencia congénita de la enzima β -galactosidasa o lactasa, ocasionando dificultad en la absorción y digestión de este azúcar, para este caso, la lactosa llega al intestino donde es fermentada por las bacterias residentes produciendo agua, gas metano e hidrógeno, causando flatulencia, dolor abdominal y diarrea acuosa, los probióticos actúan transformando la lactosa en ácidos orgánicos como el láctico y el acético y produciendo lactasa, que facilita la digestión de la lactosa en la parte alta del intestino delgado [27, 79, 112].

▪ *Helicobacter pylori* (Efecto Gastro-protector)

Estudios previos indican que los probióticos, actúan en contra de esta bacteria Gram negativa involucrada en el desarrollo de gastritis crónica, úlceras gástrica y duodenal posterior a la colonización de la mucosa del intestino, además factor de riesgo para cáncer gástrico [10, 107], inhibiendo la adherencia a los receptores glicolípidos y disminuyendo la actividad de la enzima ureasa necesaria para su supervivencia en el medio ácido del estómago [27, 49, 51]. Entre los microorganismos destacados está el *Bacillus subtilis* que secreta componentes antibióticos, el *L. reuteri* que inhibe la unión del *H. pylori* a los receptores glicolípidos a través de una proteína que tiene en su superficie celular, dando lugar a una competencia por el receptor que impide la colonización por dicha bacteria y el *L. salivarius* que produce elevadas cantidades de ácido láctico en el estómago, lo que estimula la producción de prostaglandinas endógenas quienes actúan como mecanismos de defensa con efecto protector de la mucosa gástrica [18, 53, 79].

▪ Alergias (efecto inmunomodulador)

Los alérgenos alimenticios pueden provocar una respuesta proinflamatoria en el intestino por alteración de la función de la barrera intestinal, los probióticos, actúan reduciendo la inflamación intestinal, corrigen el desbalance de los linfocitos y pueden ser efectivos en la respuesta inmune al prevenir las reacciones alérgicas, estimulando las células del Sistema Inmune en la producción de Inmunoglobulina A (IgA), citoquinas, (IL-4, IL-5, y IL-13) que a su vez promueven la secreción de inmunoglobulina E (IgE) y la eosinofilia [18, 53, 79, 80, 112].

▪ Cáncer

Se han realizado estudios en animales, indicando la reducción en el riesgo de cáncer por los lactobacilos y las bifidobacterias al modificar la microbiota intestinal, a través de la posible disminución de las enzimas fecales (glycosidasa, β - glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa) asociadas con la conversión de precarcinógenos a carcinógenos, e Inhibiendo directamente la formación de células tumorales inactivando o bloqueando el carcinógeno [107, 112]. De igual manera los lactobacilos participan en la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuáles acidifican el medio ambiente, un pH bajo se asocia a menor riesgo de cáncer colorrectal [18, 53, 79]

▪ **Infección del Tracto Genito-Urinario**

Los *Lactobacillus* presentes en la microbiota vaginal, han presentado eficacia clínica en el tratamiento de infecciones vaginales, los mecanismos de acción están basados en la capacidad de adherencia y colonización al tracto urogenital, sumado al efecto microbicida debido a la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de ácido láctico alterando este microambiente por ende la impidiendo el crecimiento de patógenos [18, 53, 79, 39].

▪ **Enfermedades Cardiovasculares**

Los elevados niveles de colesterol en sangre, se constituyen en un factor de riesgo asociado a desencadenar patologías de tipo cardiovascular, de acuerdo a lo anterior, según estudios realizados tras el consumo de lácteos fermentados en períodos determinados, hubo correlación en la reducción de los niveles séricos de colesterol, *L. reuteri* es una de las bacterias que se encuentra directamente relacionada con una disminución del 20-30% del colesterol total y de 22-35% de los triglicéridos, además aumenta la razón HDL/LDL [53].

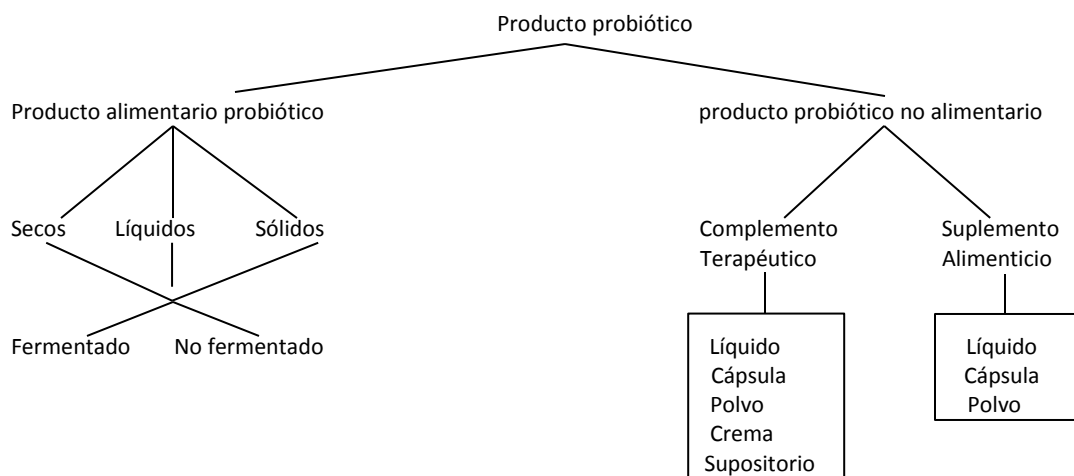
2.4.7 Requisitos de los alimentos probióticos

Durante el tránsito gastrointestinal, las bacterias probióticas, deben mantenerse viables y activas en el producto, a fin de asegurar el efecto benéfico en el consumidor, en este sentido, es importante el pH producido a partir del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto (primordialmente para las bifidobacterias), el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura, la duración de la fermentación y las condiciones de almacenamiento del producto [10, 79].

2.4.8 Presentación de probióticos

En el comercio se encuentran disponibles los probióticos en distintos formatos [31] Figura 2-6:

- Alimentos fermentados como: Lácteos, vegetales, carnes y bebidas alcohólicas artesanales fermentados.
- Suplementos nutricionales solos o asociados con suplementos vitamínicos, fibra.
- Antioxidantes.
- Agentes farmacológicos, empleando cepas únicas o mezclas de varias cepas, en dosis altas y liofilizadas para dar mayor estabilidad y conservación.
- Asociados con alimentos prebióticos, constituyendo un producto simbiótico.

Figura 2-6: Formato de los productos probióticos comercializados [31].

2.4.9 Riesgos de los probióticos en la práctica clínica

Estudios clínicos han estipulado que el riesgo de infección por el consumo de probióticos sería similar al producido por cepas comensales, las infecciones por estos microorganismos podrían ocurrir de forma natural incluso sin estar relacionadas con la ingesta de estos, los casos reportados de enfermedades con compromiso sistémico desencadenados por probióticos, son raros, para que se presenten este tipo de patologías, los pacientes deben tener algún compromiso o supresión en el sistema inmune (Diabetes, VIH, Cáncer, valvulopatías, problemas hematológicos, desnutrición, pacientes en la unidad de cuidados intensivos, prematuros y trasplantados). Con base a lo anterior se recomienda emplear con precaución la administración de probióticos especialmente en pacientes prematuros y en determinados pacientes inmunodeprimidos, como se plantea en la Tabla 2-5, donde se establecen una serie de factores predisponentes a la sepsis por probióticos [37].

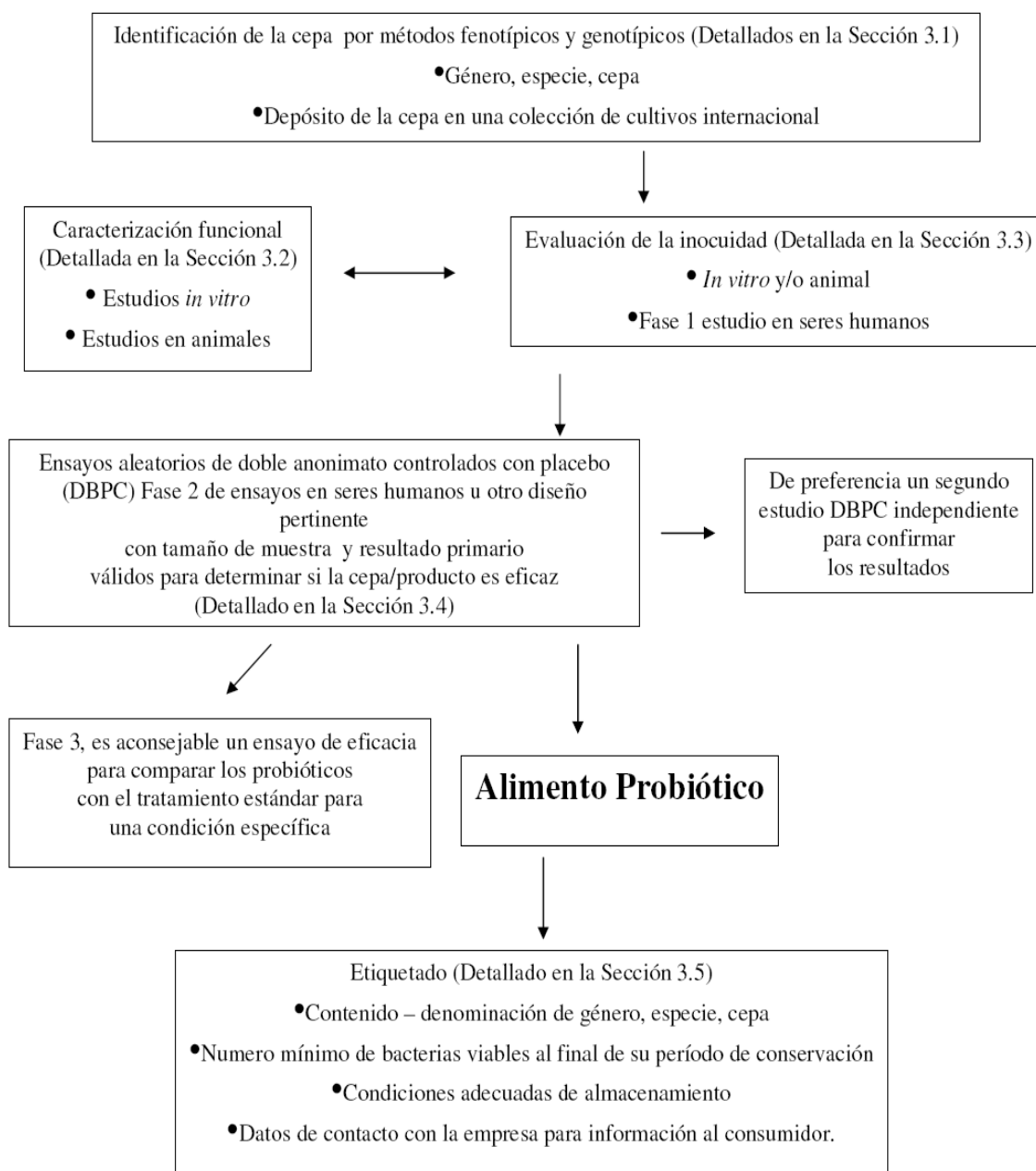
Tabla 2-5: Criterios para evaluar el riesgo de sepsis por probióticos en la práctica clínica [37].

<i>Criterios mayores</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inmunodeficiencia severa incluyendo estados de desnutrición grave o cáncer ▪ Neonatos prematuros
<i>Criterios menores</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Catéteres venosos centrales ▪ Barrera epitelial intestinal incompetente (procesos diarreicos severos, inflamación intestinal) ▪ Administración de probióticos por yeyunosostomía ▪ Administración concomitante de antibióticos de amplio espectro a los cuales los probióticos son resistentes (por ejemplo muchos <i>Lactobacillus</i> son naturalmente resistentes a la vancomicina) ▪ Probióticos con capacidad de alta adhesión a la mucosa intestinal o patogenicidad conocida ▪ Enfermedad valvular (únicamente para <i>Lactobacillus</i>)

2.5 Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconocieron la necesidad de establecer directrices para un criterio sistemático en la evaluación de probióticos en los alimentos, con el fin de identificar y delinear los requerimientos mínimos necesarios para la condición de probiótico, ver Figura 2-7.

Figura 2-7: Directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos. Tomado de la FAO/OMS



2.5.1 Pruebas *in vitro* para la selección de microorganismos probióticos

Las cepas a evaluar como probióticas deben cumplir entre otras, con las siguientes pruebas [96]:

- **Resistencia a la acidez gástrica**

Antes de llegar al tracto intestinal, las bacterias probióticas deben sobrevivir en primer lugar, a la acidez gástrica, que se presenta por la secreción de jugos gástricos como mecanismo de defensa del estómago hacia la mayoría de los microorganismos ingeridos, esta prueba está dirigida a determinar el grado de tolerancia a la acidez que presentan diferentes *Lactobacillus* [42, 59, 86].

- **Crecimiento en bilis**

Destinada a evaluar la capacidad de los potenciales probióticos para resistir los efectos de los ácidos biliares, quienes son sintetizados por el hígado, a partir de colesterol y secretados por la vesícula biliar hacia el duodeno. En la bilis se encuentra a las sales biliares actuando como detergentes, afectando la estabilidad de la membrana, demostrada *in vitro* e *in vivo* en cepas de *E. coli*, y *Enterococcus sp* [42, 64].

- **Actividad hemolítica**

Los microorganismos que producen hemolisinas pueden utilizar la hemoglobina, la hemina y la hematina de los glóbulos rojos como fuente de hierro, propiedad indeseable en los criterios de selección para un probiótico, frente a esto se hace necesario evidenciar su presencia en medios de cultivo con sangre [4,14].

- **Actividad antimicrobiana**

Las bacterias acidolácticas producen varios metabolitos con efectos antimicrobianos, esta prueba verifica la presencia de inhibidores sintetizados por las cepas en estudio, tales como bacteriocinas u otro tipos de compuestos tóxicos [4, 14, 27, 64].

- **Susceptibilidad a los antibióticos**

Los microorganismos probióticos, pueden presentar resistencia a los antibióticos, resistencia relacionada con genes localizados en el cromosoma o en los plásmidos. Con base a lo anterior, la FAO/OMS estableció “No deberían utilizarse en alimentos bacterias que contengan genes transferibles de resistencia a medicamentos”, concluyendo que cuando se proceda a la selección de cepas probióticas, se recomienda que no posean genes transmisibles que codifiquen la resistencia a medicamentos utilizados con fines clínicos [96, 109]. En contradicción, para algunos autores, es deseable que las cepas sean resistentes a los antibióticos, debido al elevado consumo de antibióticos que afecta la microflora benéfica, lo que facilita su eliminación; de igual manera frente a casos de, terapia combinada (Probióticos y Antibióticos) y como cultivos iniciadores en productos que contienen antibióticos [60, 78].

Existen otras valoraciones como adhesión celular, actividad inmunomoduladora, capacidad antioxidante y pruebas *in vivo*, entre otras, que no fueron valoradas en el presente estudio.

3. Materiales y métodos

3.1 Localización del estudio

El estudio de aislamiento, identificación y evaluación de cepas probióticas de pan de abejas de *Apis mellifera* y su aplicación en la fermentación de polen apícola, fueron realizadas en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA de la Universidad Nacional de Colombia. Este trabajo hizo parte del programa “Estrategias para establecer la denominación de origen de los productos de las abejas en Colombia” y del proyecto “Cualificación de productos de las abejas: Miel, Polen y Propóleos mediante indicadores microbiológicos” financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Los apiarios utilizados están ubicados en la Facultad de Biología de la Universidad Nacional sede Bogotá (humedad relativa 77%, 2556 m.s.n.m, 21°C)

3.2 Obtención de muestras

Las muestras de pan de abejas fueron recogidas al azar en colmenas sanas de *Apis mellifera*, tomando un marco por colmena donde se observara mayor cantidad de polen alveolar. El muestreo se realizó por un período de cinco meses. Se recogieron un total de 38 muestras que fueron transportadas en bolsas plásticas, a temperatura ambiente hasta el laboratorio para ser procesadas bajo cabina de flujo laminar, las muestras que no fueron procesadas fueron mantenidas a 4°C por un tiempo máximo de 7 días.

3.3 Aislamiento y selección de cepas de *Lactobacillus sp*

El polen alveolar fue obtenido con una cucharilla de acero inoxidable estéril y depositado en tubos estériles tapa roscas en una cantidad aproximada de 10 g.

Se realizaron siembras de las muestras en agar Man Rogosa Sharpe (MRS), con diversas metodologías, a través de la siembra directa en superficie, siembra en profundidad, a través de diluciones seriadas 1:10, tomando 4 g para 36 ml en solución salina fisiológica estéril con siembra de 0.1 ml por cada dilución, pre enriquecimiento en caldo MRS por 24 h, y la adición de miel al 5% directamente a la preparación del agar MRS, con el fin de recuperar el mayor número y variedad de colonias; los medios fueron incubados a 37°C de 24-72 horas bajo condiciones de microaerofilia [50, 63, 75, 86, 121].

A partir de las colonias aisladas, se procedió a la selección de aquellas que cumplieran con las propiedades que permitían considerarlas como pertenecientes al género en estudio, por medio

de la observación macroscópica de las colonias en medio MRS y MRS modificado (azul de anilina) para ayudar al reconocimiento de los microorganismos lácticos [23, 32, 60, 122]. La valoración microscópica se efectuó a través de las coloraciones de Gram y Schaeffer-fulton, observándose la morfología Gram positiva y la ausencia de esporas respectivamente [63, 64, 82, 86, 98].

Se realizaron pruebas bioquímicas como catalasa y oxidasa, las cepas identificadas como catalasa y oxidasa negativas fueron evaluadas para potencial probiótico [63, 64, 82, 86, 98].

Las cepas aisladas fueron conservadas en caldo MRS con 20% (p/v) de glicerol y mantenidas a -20°C, con reactivación semanal para la realización de las diferentes pruebas [63, 86, 120].

3.4 Pruebas *in vitro* para potencial probiótico

3.4.1 Tolerancia a pH ácido

Se evaluó el comportamiento frente a cuatro pH diferentes 3.0, 4.0, 5.0 y 7.0 en 3 ml de caldo MRS, ajustando los pHs con HCl 1N con el potenciómetro, los caldos estériles, fueron inoculados con un cultivo axénico y fresco de cada uno de los aislados en prueba, hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml). Los caldos se incubaron a 37°C, por 2h y 4h, se realizaron siembras sobre agar MRS, que fueron incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia [63, 86]. A las cepas resistentes al pH 3.0 por 4h, se les realizó un recuento en superficie para cuantificar las UFC/ml (Anexo A).

3.4.2 Crecimiento en bilis

Para esta prueba el crecimiento se realizó frente a tres concentraciones de bilis de buey (deshidratada Sigma) 0.3, 0.5 y 1.0 % p/v en 3 ml caldo MRS, Se inóculo, teniendo un cultivo axénico y fresco de las colonias, hasta conseguir una turbidez del 0.5 de la escala de Mc Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/ml), con una incubación de 2 y 4h a 37°C, se realizó la siembra en agar MRS realizando su lectura 72h después. Posteriormente las cepas que sobrevivieron a la concentración de 1.0%, se les realizó recuento en superficie para cuantificar las UFC/ml (Anexo A) [63, 64, 86, 87, 133].

3.4.3 Actividad hemolítica

A partir de un cultivo axénico y fresco, se sembró una colonia en Agar Columbia con 5% de sangre de cordero, las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones microaerofílicas de 24-72 h, posterior al tiempo de incubación se realizó la lectura de la presencia de hemolisis a las 24, 48 y 72 h, [4, 14, 77, 86, 109].

- Hemólisis β : Rompimiento total de los Glóbulos rojos, observándose zonas claras alrededor de las colonias en el medio de cultivo.

- Hemólisis α : Rompimiento parcial de Glóbulos rojos, observándose zonas parcialmente claras alrededor de las colonias en el medio de cultivo.
- Hemólisis γ : No hay rompimiento de Glóbulos rojos, no se observan zonas claras alrededor de las colonias.

3.4.4 Actividad antimicrobiana

Para valorar esta propiedad a los aislados se enfrentaron a cepas de referencia, Gram positivas y Gram negativas. Según la metodología descrita por Schillinger y Lücke (1989), [14, 63, 64, 98, 109, 117, 126, 137].

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Cultivos puros de las cepas de referencia, se suspendieron en solución salina con una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland, que fueron sembradas masivamente en el agar Trypticase de soya (TSA); por otro lado se elaboraron cultivos de cada uno de los aislados por crecimiento masivo en el agar MRS, de este cultivo fueron cortados cilindros de agar, que fueron superpuestos en las placas donde se tenia sembrada la suspensión de las cepas de referencia teniendo en cuenta que la superficie crecida quedara en contacto con la superficie de la cepa de referencia, posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24-48h, con lectura de presencia/ausencia de halos de inhibición (Anexo B).

La interpretación se indicó bajo el concepto de valor de inhibición absoluto y relativo, expresado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de Inhibición} = (I-DC)/2$$

Dónde:

DC: Diámetro del cilindro del cultivo (mm)

I: Diámetro de Inhibición

3.4.5 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos

La susceptibilidad a los antibióticos se determinó en medios sólidos empleando discos comerciales de antibióticos, según el método estándar de difusión en discos Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los resultados se interpretaron como sensibles (S) o resistentes (R). [5, 14, 19, 20, 63, 77, 78, 86, 87, 94, 126, 140].

Los inóculos bacterianos de los aislados se ajustaron a una turbidez de 0.5 de la escala de Mc Farland, esta suspensión fue colocada y esparcida sobre la superficie del agar MRS con previa adición de azul de anilina [5, 86], a continuación fueron colocados los sensibilizadores con un

dispensador, las placas se incubaron a 37°C de 24-72h en condiciones de microaerofilia, posterior al tiempo de incubación la lectura fue efectuada por la medición del diámetro de la zona de inhibición y la interpretación se basó en los estándares de diámetros de inhibición para *Enterococcus spp*, microorganismo cercano filogenéticamente al *Lactobacillus*, género que no posee valores estandarizados para estudios de susceptibilidad en la técnica de difusión en disco[1, 8, 20].

Los Antibióticos empleados, concentraciones y siglas, se indican en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Discos comerciales empleados Oxoid®.

Antibiótico	Sigla	Concentración
Eritromicina	E	15 µg
Gentamicina	CN	10 µg
Metronidazol	MTZ	5 µg
Trimetoprim sulfametoxazol	SXT	25 µg
Amoxicilina	AML	10 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Enrofloxacina	ENR	5 µg

3.5 Identificación bioquímica y molecular de las cepas

3.5.1 Identificación bioquímica

Se efectuó para aquellas cepas que cumplieron con las condiciones de probiótico en cuanto a acidez, a crecimiento en bilis, con efecto antibacteriano, sin presencia de hemolisinas y con perfil de susceptibilidad a antibióticos adecuado. Se realizó mediante la utilización de una galería API® 50 CHL, conformado por 50 cúpulas que contienen como sustrato diferentes carbohidratos más un indicador de pH, con el fin de establecer el patrón fermentativo del género *Lactobacillus* creando un perfil bioquímico interpretado por el programa informático APIWEB® (BioMérieux), anexo al kit [50, 71, 109].

A partir de cada cultivo puro se prepararon suspensiones en el medio que acompaña el kit API 50 CHL Medium con una turbidez en la escala de Mc Farland de 0.2, las suspensiones se inocularon en cada cúpula de la galería, empleando una por cada aislado. La lectura se interpretó, postincubación a 37°C por 24-48h con base en la fermentación de carbohidratos produciéndose un viraje del indicador del pH.

3.5.2 Identificación molecular

Los aislados pertenecientes al género *Lactobacillus*, según pruebas bioquímicas, fueron identificados molecularmente.

▪ Extracción de ADN

En la extracción del ADN genómico, se empleó un método enzimático combinado con fenol cloroformo, partiendo de un cultivo puro mantenido en caldo MRS, posteriormente se siguieron las indicaciones del protocolo (Anexo D).

▪ Reacción en cadena polimerasa (PCR)

Para la confirmación del género y la especie, se utilizó la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR), los iniciadores usados fueron 27 F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') [67], que amplifican un fragmento de 1470 pb, del gen que codifica para la subunidad 16s del ARNr de las bacterias [55, 63, 109]. El sitio donde se anillan los iniciadores en este gen es en sus extremos, donde su secuencia es conservada para todas las especies de bacterias, en el interior su secuencia es altamente polimórfica y específica de cada género y especie, lo cual permite diferenciarlas mediante una posterior secuenciación de cada amplificado.

Se tomaron 5 µL de ADN extraído (2 ng) de cada uno de los cuatro aislados escogidos. Cada muestra de ADN se suspendió en 45 µL de la mezcla de PCR que contenía una concentración final de: 1X de solución tampón de PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 µM de cada iniciador 27F y 1492R, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de Taq ADN polimerasa (TucanTaq ADN polimerasa, Corpogen Bogotá Colombia) y agua destilada ultrapura hasta completar un volumen final de 50 µL. Como control positivo se empleó ADN extraído de una cepa de referencia *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) y como control negativo se empleó agua ultrapura.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PxE 0.2 (Thermo Electron Corporation, USA) con las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, apareamiento de los iniciadores a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 2 minutos y extensión final a 72°C por 3 min.

▪ Electroforesis en gel de agarosa

Alícuotas de 5 µL de los amplicones fueron mezclados con 5 µL de solución tampón de carga y sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio, en solución tampón TBE 1X (90 mM Tris, 90 mM Borato y 2 mM EDTA, pH 8.3). Los fragmentos fueron corridos a 70 voltios en una hora y luego visualizados en un transiluminador UV (Spectroline USA). El tamaño de los amplificados obtenidos posteriormente se comparó con un marcador molecular de 100 pb (Promega WI, USA).

▪ Secuenciación y análisis bioinformático

El volumen restante de todos los productos de PCR (45 μ L) de las 4 cepas y del control positivo (*L. plantarum*), fueron enviados a la Corporación Corpogen en Bogotá, quienes recibieron estas muestras y luego las remitieron a MACROGEN en la República de Corea del Sur, para que allí realizaran la secuenciación, por el método capilar en ambas cadenas del amplificado (secuenciación doble), con el fin de obtener una mejor secuencia consenso.

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a realizar un ensamblaje de las dos cadenas complementarias de cada amplificado, mediante el programa Bioedit. Con el fin de obtener una identificación por género y especie de cada Lactobacilo, las secuencias consenso pertenecientes a cada aislamiento, fueron alineadas y comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos del GeneBank del NCBI, usando la herramienta BLASTn.

3.6 Fermentación de polen

Para hacer una aproximación en la obtención de un alimento funcional tipo pan de abejas industrial, se empleo polen apícola deshidratado (comercial) como sustrato para la realización de las fermentaciones, utilizando cuatro cepas nativas previamente caracterizadas como *L. kunkeei* vs la cepa comercial *Lactobacillus acidophilus*. Para el proceso se siguió la metodología propuesta por Fuenmayor (2009), usando una matriz de polen en similares condiciones de proceso.

La cepa comercial, correspondió a un cultivo liofilizado de la marca Danisco[®] referenciada como probiótica, comercializada bajo el nombre de HOWARY dophilus LYO 40 DCU, liofilizada en polvo, libre de humedad y mantenida a -20°C durante su uso.

Lactobacillus acidophilus (*Lb. acidophilus* A-1, conocido también como NCFM). Ficha técnica (Anexo F).

3.6.1 Preparación de los inóculos

El inóculo de las cepas nativas, fue preparado teniendo un cultivo axénico y fresco de las cepas mantenidas en el agar MRS en microaerofilia a 37°C de 24-48h, recogiendo de 3 a 4 colonias en 5 ml de caldo MRS con una incubación de 8-10h hasta conseguir una turbidez correspondiente una D.O de 0.10 – 0.130 a una longitud de onda de 625 nm, equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml, empleando un espectrofotómetro (Genesys[®] 5), adicionalmente se realizo el recuento celular utilizando el agar MRS, siguiendo las indicaciones del anexo D, e incubándose a 37°C en microaerofilia de 24-72h [5, 17, 126, 129].

El inóculo de la cepa comercial se preparó minutos antes de la utilización, teniendo como referencia el recuento reportado por la casa comercial y activando el microorganismo según las instrucciones indicadas.

3.6.2 Matriz de polen para la fermentación

Se empleó un lote único de polen colectado en la zona de Une (Cundinamarca), para preparar una adecuada mezcla de fermentación, en un sustrato duro y compacto como el polen, se hizo necesario tratarlo térmicamente a 121 °C por 15 min, con el objeto de lograr un ablandamiento de sus capas y obtener un sustrato estéril.

El polen fue homogenizado manualmente con agua estéril siguiendo una proporción 2:1, utilizando un agitador estéril de acero inoxidable, a la anterior mezcla, se le agregó un 5 % (v/v) del inóculo del cultivo, la mezcla fue servida en frascos de vidrio de 110 ml hasta las $\frac{3}{4}$ partes del frasco, posteriormente las preparaciones fueron colocadas en incubación a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 36h con monitoreo de pH, acidez y de viabilidad celular cada 12h partiendo del tiempo 0, cada ensayo se realizó por triplicado [35].

3.6.3 Valoración de pH y acidez libre titulable

Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) siguiendo metodologías reconocidas internacionalmente por la Association of Analytical Communities (AOAC)[6].

Las mediciones de los valores de pH y acidez en las fermentaciones, se realizaron mediante el uso de un titulador automático Mettler Toledo [®]T70, la concentración del titulante fue de 0.05 M de NaOH. Las muestras a analizar se prepararon pesando 3 g para 30 ml de agua desionizada, con agitación constante de 30 min, posteriormente la suspensión fue filtrada al vacío al kitasato, el filtrado fue transferido al vaso del titulador.

En el tiempo 0h la acidez en meq/kg fue tomada como 0 meq/kg y para los tiempos 12, 24 y 36h fue calculada en base a la siguiente ecuación:

$$A_{pr} = A_t - \bar{A}_i$$

Dónde:

A_{pr} es la acidez libre producida a partir del momento de la inoculación hasta un tiempo t.

A_t es la acidez libre de la muestra medida en un tiempo t.

\bar{A}_i es la acidez inicial promedio para el mismo ensayo.

3.6.4 Recuento celular de las BAL

Para las diluciones de las muestras se siguieron las indicaciones del anexo A y para la siembra se siguieron las indicaciones del anexo C, con incubación a 37°C de 24-72h en condiciones microaerofílicas.

Los resultados se expresaron en UFC/g.

3.6.5 Evaluación sensorial

Las muestras obtenidas por fermentación fueron probadas y valoradas por tres personas conocedoras del pan de abejas natural, se estimaron características como sabor, olor y aspecto.

Las apreciaciones en escala de valor fueron:

Muy agradable, Agradable, Poco agradable y Desagradable.

3.7 Análisis Estadístico

En las fermentaciones, se empleó un diseño factorial tipo AB, el primer factor correspondió a las cepas nativas con seis niveles (cepas número 6, 7, 10, 11, *L. acidophilus* (control positivo cp) y Blanco (control negativo cn)) y el segundo factor correspondió al tiempo de fermentación (h) con cuatro niveles (0, 12, 24, 36); donde el tiempo 0 reflejó las condiciones iniciales de fermentación.

Este diseño permitió comparar los tratamientos de las cepas aisladas 6, 7, 10, 11, de la cepa comercial (*L. acidophilus*) y del blanco, en función del tiempo de la fermentación, combinando las dos variables.

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico R-2.15.0, realizando un Análisis de Varianza (ANOVA) con el fin de comparar los datos obtenidos y establecer las significancias y diferencias de los efectos de las variables en las respuestas, y la comparación entre promedios para encontrar las diferencias significativas entre tratamientos, llevado a cabo a través de la prueba *Tukey* con una probabilidad de $P < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Aislamiento y selección de *Lactobacillus sp*

4.1.1 Aislamiento y selección de aislados por características microscópicas y macroscópicas

A partir de las treinta y ocho muestras procesadas de pan de abejas de *Apis mellifera*, se obtuvieron, cuarenta y dos colonias en el medio MRS, a las que se les realizaron observaciones microscópicas, con tinción de Gram, conservándose únicamente las colonias Gram positivas con morfología bacilar compatibles con el género *Lactobacillus*, Tabla 4-1.

Del total de las muestras recogidas, el 26% de las colonias obtenidas fueron compatibles con la morfología de las bacterias ácido lácticas tipo *Lactobacillus*, bacilos Gram positivos largos y cortos y en algunos casos curvos, el 22% correspondió a cocobacilos Gram negativos, el 21% a Levaduras y el 31% a cocos Gram positivos, Figura 4-1.

Figura 4-1: Porcentaje % de microorganismos según el Gram en el pan de abejas.

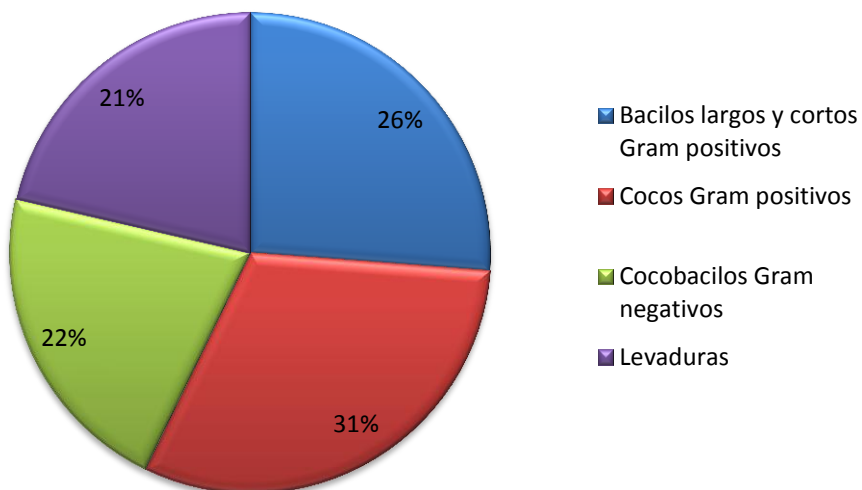
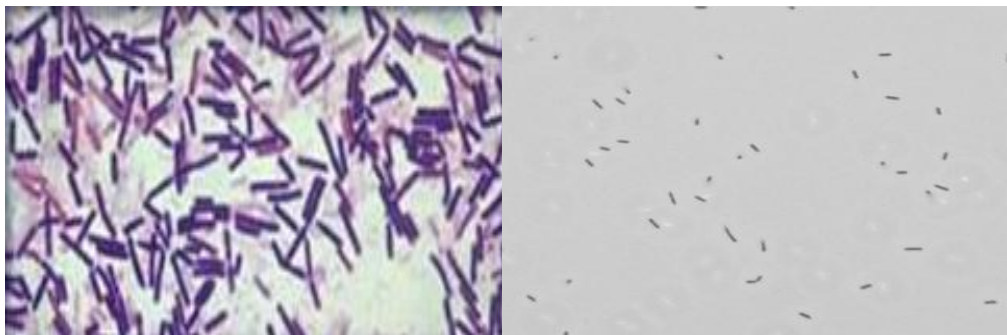


Tabla 4-1: Identificación microscópica por Gram de las colonias obtenidas.

Número de aislado	Coloración de Gram
1	Coco Gram positivo
2	Bacilo largo Gram positivo
3	Cocobacilo Gram negativo
4	Coco Gram positivo
5	Bacilo largo Gram positivo
6	Coco Gram positivo
7	Coco Gram positivo
8	Levadura
9	Bacilo corto Gram positivo
10	Cocobacilo Gram negativo
11	Coco Gram positivo
12	Coco Gram positivo
13	Bacilo corto Gram positivo
14	Cocobacilo Gram negativo
15	Bacilo largo Gram positivo
16	Levadura
17	Coco Gram positivo
18	Levadura
19	Levadura
20	Bacilo corto Gram positivo
21	Cocobacilo Gram negativo
22	Coco Gram positivo
23	Levadura
24	Cocobacilo Gram negativo
25	Coco Gram positivo
26	Bacilo corto Gram positivo curvo
27	Cocobacilo Gram negativo
28	Bacilo largo Gram positivo
29	Levadura
30	Bacilo largo Gram positivo
31	Cocobacilo Gram negativo
32	Levadura
33	Coco Gram positivo
34	Cocobacilo Gram negativo
35	Bacilo corto Gram positivo curvo
36	Levadura
37	Coco Gram positivo
38	Levadura
39	Cocobacilo Gram negativo
40	Coco Gram positivo
41	Bacilo corto Gram positivo curvo
42	Coco Gram positivo

Once colonias (sombreadas) de las cuarenta y dos, correspondieron a las características microscópicas deseadas Figura 4-2.

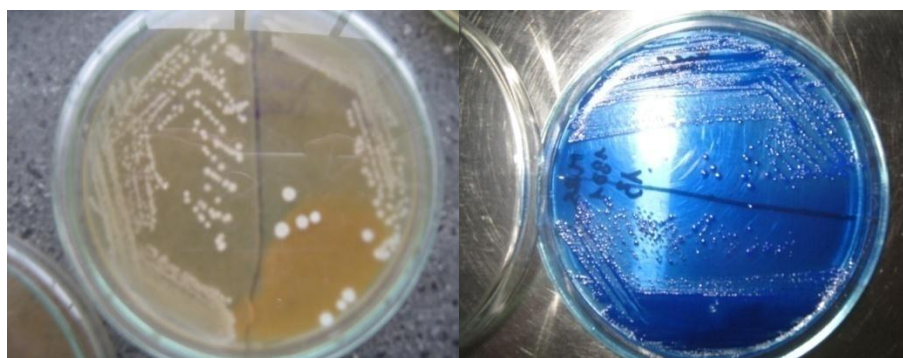
Figura 4-2: Características microscópicas del género *Lactobacillus*, en la fotografía izquierda bacilos Gram positivos largos y en la fotografía derecha bacilos cortos Gram positivos.



La parte microscópica continuó con la tinción de Schaeffer-Fulton, a través de esta coloración se pudo confirmar que el 100% de los 11 aislados fueron bacilos no formadores de espora, correspondiendo morfológicamente al género *Lactobacillus*.

Dentro de las características macroscópicas, se encontraron colonias de color blanco con aspecto circular, ligera elevación, convexas y no pigmentadas, algunas de consistencia mucosa y otras seca Figura 4-3.

Figura 4-3: Características macroscópicas del género *Lactobacillus*, en la fotografía izquierda colonias en el agar MRS y en la fotografía derecha colonias en el agar MRS con adición de azul de anilina.



4.1.2 Selección por pruebas bioquímicas (Catalasa y Oxidasa)

Para todos los aislados las pruebas de catalasa y oxidasa fueron negativas. De esta manera los once aislados correspondieron con los criterios morfológicos y bioquímicos que presenta el género *Lactobacillus*, y entraron a la evaluación como potenciales probióticos.

4.2 Pruebas *in vitro* para potencial probiótico

4.2.1 Tolerancia a pH ácido

En la Tabla 4-2 se observa la resistencia y el conteo de los aislados frente a los diferentes pH utilizados, se indica en sombreado los aislados que cumplieron con las condiciones deseadas de tolerancia a pH 3 por 4h. El aislado 4 no cumplió con la condición deseada al no tolerar el pH 3.0, por lo tanto no se le realizó recuento.

4.2.2 Crecimiento en bilis

En la Tabla 4-3 se observa la resistencia a la acción de la bilis y el conteo de los aislados que se mantuvieron viables, se indica en sombreado los que cumplieron las condiciones deseadas de crecimiento en bilis a una concentración de 1.0% por 4h. En este ítem se evidenció que los aislados 4, 8 y 9 no tuvieron el desempeño esperado de selección al no crecer en bilis al 0.5% y al 1.0%, por lo tanto no se les realizó recuento.

4.2.3 Actividad hemolítica

Se observan los comportamientos presentados por los aislados en estudio en el medio de cultivo Agar Columbia con sangre, cuatro de los once aislados no crecieron y de los siete que crecieron, dos presentaron α -hemólisis siendo un criterio más de eliminación y cinco γ -hemólisis (sombreados). En esta fase los aislados 2 y 9 no cumplen con el criterio de selección, como se puede observar en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Crecimiento y tipo de hemólisis presentado por los once aislados.

Aislados	Crecimiento	Hemólisis
1	Negativo	-
2	Positivo	α
3	Negativo	-
4	Negativo	-
5	Positivo	γ
6	Positivo	γ
7	Positivo	γ
8	Negativo	-
9	Positivo	α
10	Positivo	γ
11	Positivo	γ

Tabla 4-2: Resultados de Tolerancia a pH ácido.

Aislado	Lectura 2h				Lectura 4h				Recuento UFC/ml pH 3.0 4h
	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 3.0	pH 4.0	pH 5.0	pH 7.0	
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	3.3 X 10 ⁵
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	9.4 X 10 ⁵
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.7 X 10 ⁵
4	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	-
5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	9.0 X 10 ⁵
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	3.4 X 10 ⁶
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	9.9 X 10 ⁶
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.9 X 10 ⁵
9	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	2.2 X 10 ⁶
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	5.5 X 10 ⁶
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	4.0 X 10 ⁶

Tabla 4-3: Resultados de Crecimiento en bilis.

Aislado	Lectura 2h				Lectura 4h				Recuento UFC/ml 1.0% 4h
	0.3 %	0.5 %	1.0 %	Caldo MRS	0.3 %	0.5 %	1.0 %	Caldo MRS	
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.0 X 10 ⁶
2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	9.9 X 10 ⁵
3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	2.1 X 10 ⁵
4	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	-
5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	9.5 X 10 ⁵
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	1.8 X 10 ⁶
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	2.8 X 10 ⁶
8	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	-
9	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	-
10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	8.4 X 10 ⁶
11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	3.9 X 10 ⁶

4.2.4 Actividad antibacteriana

En la Tabla 4-5, los resultados están expresados como positivo o negativo y soportados con el valor de inhibición absoluto y el valor de inhibición relativo entre paréntesis; se seleccionaron los aislados que ejercieron antagonismo frente a al menos tres de las cuatro cepas de referencia, teniendo en cuenta que ninguna fue efectiva para *B. subtilis*.

Tabla 4-5: Resultados de Actividad antibacteriana.

Aislado	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo 7 (0.5)	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo 13(3.5)	Positivo 14(4)	Negativo	Negativo
5	Positivo 15 (4.5)	Positivo 14 (4)	Positivo 12 (3)	Negativo
6	Positivo 15 (4.5)	Positivo 13 (3.5)	Positivo 11 (2.5)	Negativo
7	Positivo 14 (4)	Positivo 11 (2.5)	Positivo 11 (2.5)	Negativo
8	Negativo	Positivo 11 (2.5)	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	Positivo 15 (4.5)	Positivo 10 (2)	Positivo 11 (2.5)	Negativo
11	Positivo 11 (2.5)	Positivo 12 (3)	Positivo 11 (2.5)	Negativo

En la Figura 4-4 se observa el efecto antagónico ejercido sobre la cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 4-4: Actividad antimicrobiana sobre el *S. aureus* ATCC 25923.



Evaluados en su conjunto los cuatro criterios anteriores (tolerancia a pH ácido, crecimiento en bilis, actividad hemolítica y actividad antimicrobiana) se seleccionaron las cepas 5, 6, 7, 10 y 11 para la valoración de susceptibilidad a antibióticos.

4.2.5 Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

En la Tabla 4-6, se muestran los resultados de las cepas a los antibióticos expresados como Sensible o Resistente, de acuerdo al estándar de difusión en discos por la Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI:

SENSIBILIDAD (S): No hay crecimiento alrededor del disco comercial, con medición del halo de inhibición (mm).

RESISTENCIA (R): Hay crecimiento alrededor del disco comercial, no hay presencia de halo de inhibición.

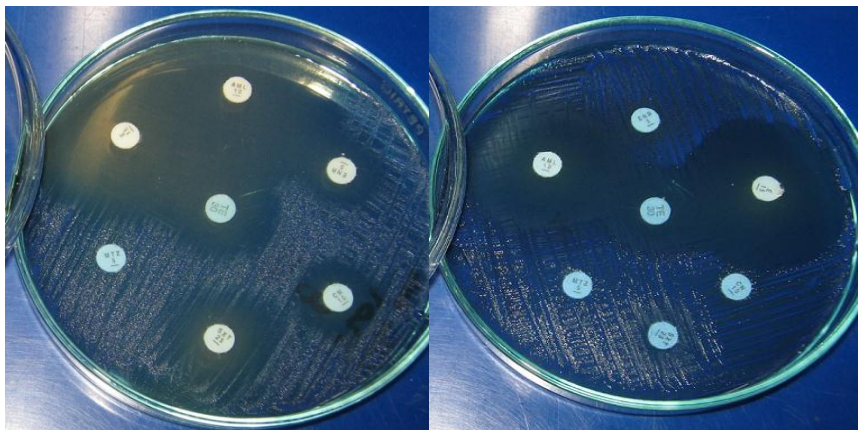
Los datos numéricos correspondientes al halo de inhibición en mm se ubican entre paréntesis; se seleccionó el aislado 7 que presentó sensibilidad frente a tres de los siete antibióticos probados y a los aislados 6, 10 y 11 que presentaron sensibilidad frente a dos antibióticos.

Tabla 4-6: Resultados de sensibilidad a antibióticos. **E:** Eritromicina, **CN:** Gentamicina, **TE:** Tetraciclina, **AML:** Amoxicilina, **SXT:** Trimetoprim sulfa, **MTZ:** Metronidazol, **ENR:** Enrofloxacina.

Aislado	E (15µg)	CN (10 µg)	TE (30 µg)	AML (10 µg)	SXT (25 µg)	MTZ (5 µg)	ENR (5 µg)
5	R	R	R	S (22)	R	R	R
6	S (32)	R	R	S (30)	R	R	R
7	S (36)	R	R	S (40)	S (16)	R	R
10	S (24)	R	R	S (22)	R	R	R
11	S (28)	R	R	S (30)	R	R	R

En la Figura 4-5 se observa la prueba de sensibilidad a los antibióticos ejercidos sobre los aislados, se evidenció claramente las zonas de inhibición alrededor del sensidisco comercial.

Figura 4-5: Prueba de sensibilidad a los antibióticos.



4.3 Identificación bioquímica y molecular de las cepas

4.3.1 Identificación bioquímica

En la Figura 4-6 se observa el montaje de las 49 pruebas de fermentación y el control (Sistema API®50 CHL) realizado para el aislado 11 con incubación de 48h, donde se evidenció la fermentación de la glucosa, fructosa y de la sacarosa únicamente, comportamiento que fue similar para los aislados 6, 7 y 10.

Figura 4-6: Sistema API®50 CHL con 48h de incubación.



En la Tabla 4-7, se observan las identificaciones preliminares realizadas por el programa informático de identificación *apiweb*[™], los resultados obtenidos arrojaron los nombres género y especie, con un porcentaje bajo de confiabilidad en la identificación.

Tabla 4-7: Resultados obtenidos en el programa informático de identificación *apiweb*[™].

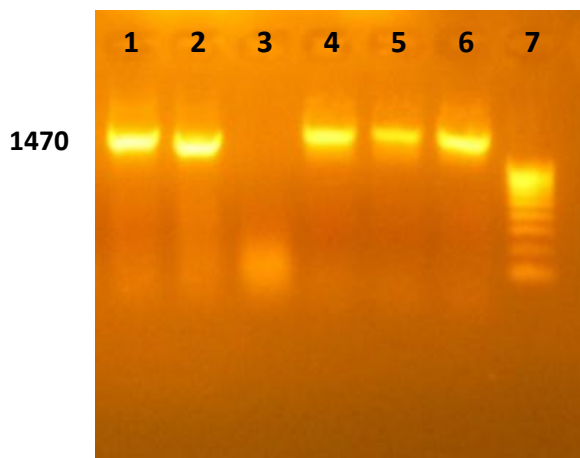
Aislado	Identificación	% Confiabilidad
6	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	81.4
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	72.3
7	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	85.2
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	76.1
10	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	82.9
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	70.8
11	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	83.7
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	73.2
Control positivo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95.3

De esta forma se confirmó a los aislados como pertenecientes al género sin tener aún clara la identificación de la especie.

4.3.2 Identificación molecular

El tamaño de los amplificados obtenidos fue de 1470 pb, los cuales fueron comparados con un marcador molecular de 100 pb (Promega WI, USA) Figura 4-7.

Figura 4-7: Electroforesis de productos de PCR de los aislados.



Carril 1: Cepa 6. **Carril 2:** Cepa 7. **Carril 3:** Control negativo. **Carril 4:** Cepa 10. **Carril 5:** Cepa 11. **Carril 6:** Control positivo *L. plantarum*, **Carril 7:** Marcador de peso (escalera de 100 pb).

El alineamiento de las cuatro secuencias permitió obtener identidades entre el 99 y el 100% con las secuencias de *Lactobacillus kunkeei* depositadas en el GenBank del NCBI, (Anexo E). Adicionalmente el alineamiento de la secuencia del control positivo, arrojó una identidad del 100% con *Lactobacillus plantarum*.

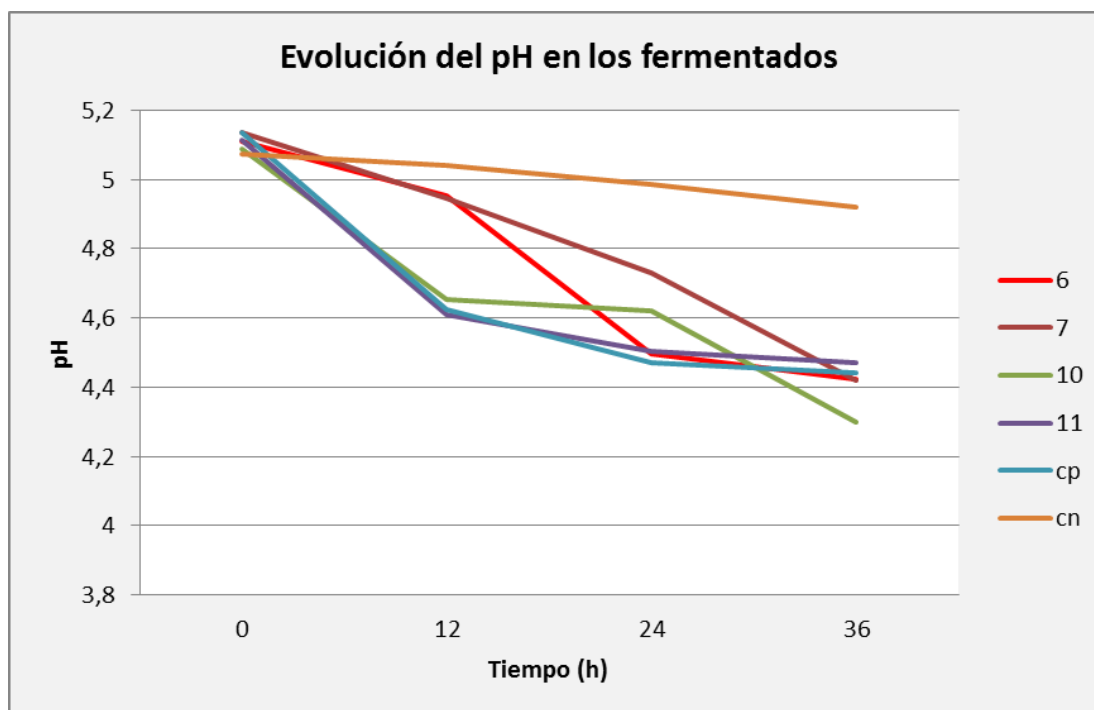
4.4 Fermentación de polen

Las cuatro cepas seleccionadas 6, 7, 10 y 11, que se destacaron previamente por su potencial probiótico, y que fueron sometidas a fermentación mostraron los siguientes resultados:

4.4.1 Medición de pH

En la Figura 4-8, se observa el descenso del pH producido por cada una de las cepas en estudio (6, 7, 10, 11, *L. acidophilus* (control positivo cp) y blanco (control negativo cn), en el transcurso de las 0, 12, 24 y 36h de la fermentación de los polenes inoculados; la gráfica permite hacer la comparación entre el desempeño de cada una de las cepas vs los controles.

Figura 4-8: Comportamiento del pH para cada cepa en los ensayos de fermentación.

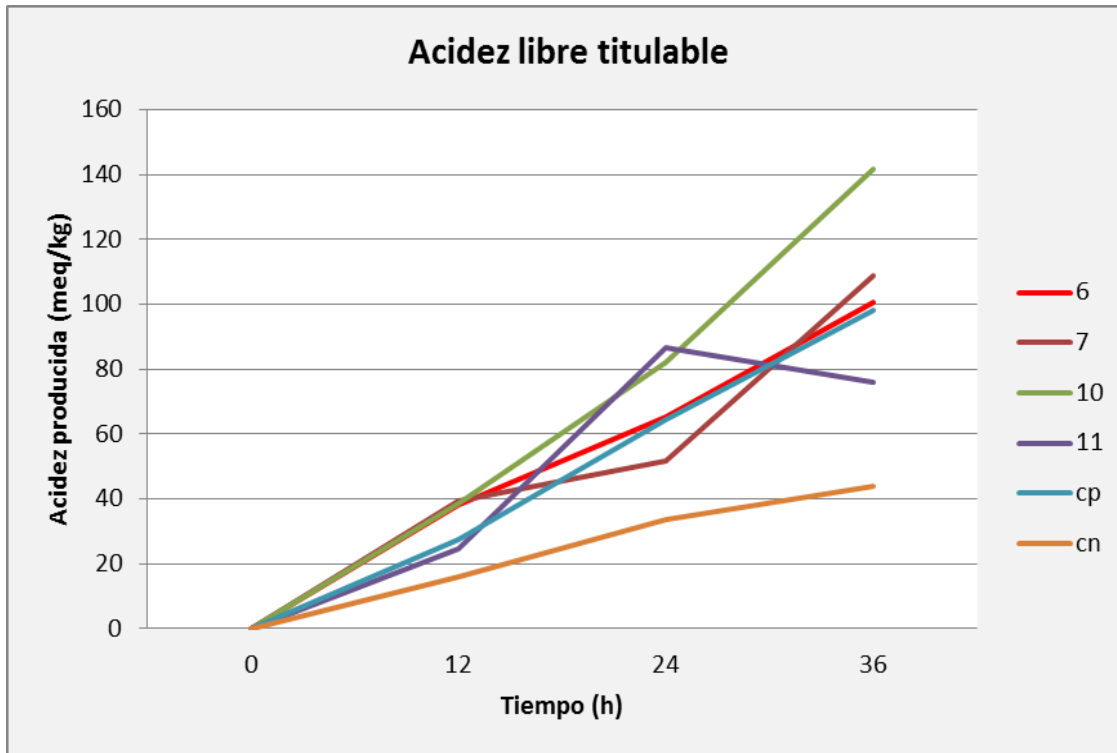


La reducción de pH es particularmente marcada a las 12 h. El descenso máximo de pH se logró con la cepa 10 a un valor de 4,3, las cepas restantes presentaron un valor cercano al control positivo de 4,44.

4.4.2 Medición de la acidez libre titulable

En la Figura 4-9, se observa el comportamiento de la acidez producida por cada una de las cepas en estudio (6, 7, 10, 11, *L. acidophilus* (cp) y blanco (cn), en el transcurso de las 0, 12, 24 y 36h; la gráfica permite hacer la comparación entre el desempeño de la cepa vs los controles.

Figura 4-9: Comportamiento de la acidez para cada cepa durante la fermentación.



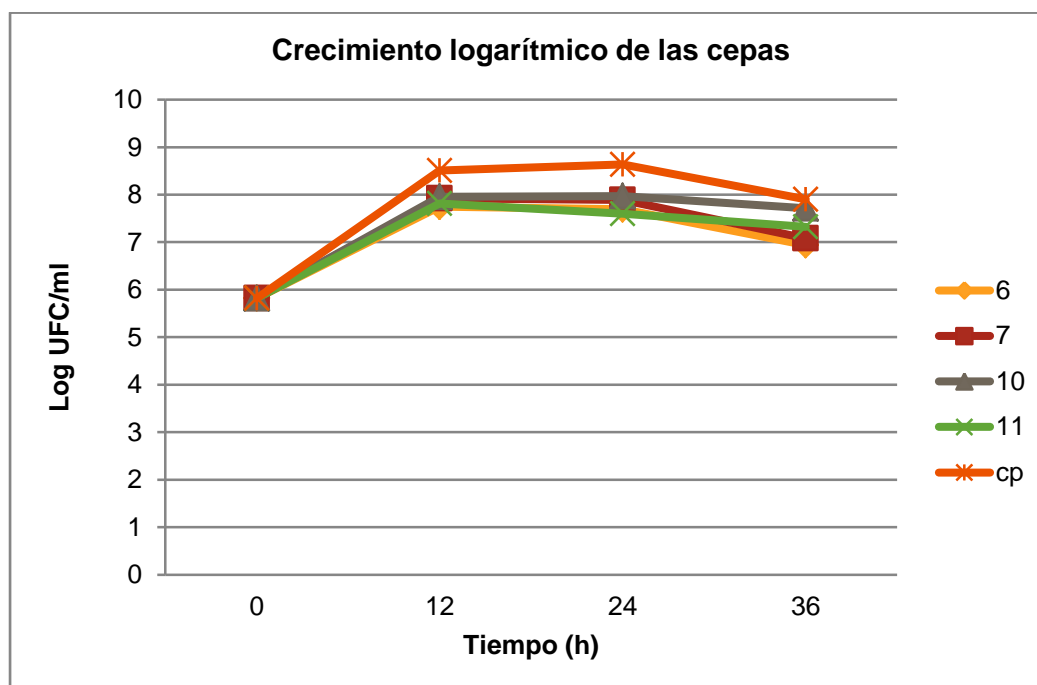
La cepa 10 registro la mayor acidez libre titulable de 141.6 meq/kg y la cepa 11 presento un comportamiento irregular con el valor más alto de 86.6 meq/kg a las 24h y el valor más bajo de 76.2 meq/kg a las 36h.

4.4.3 Recuento celular de las BAL

La sobrevivencia al proceso fermentativo de las cepas en estudio y del control positivo (*Lactobacillus acidophilus*) en UFC/g, transcurrido el tiempo de 0, 12, 24 y 36 h se encuentran graficados en la Figura 4-10.

En la Figura 4-10, se observa el crecimiento y viabilidad de las cepas (6, 7, 10, 11, *L. acidophilus* (cp)), en el transcurso de las 0, 12, 24 y 36h de incubación, las cinco cepas mantuvieron la viabilidad en forma semejante durante el proceso experimental.

Figura 4-10: Dinámica poblacional durante la fermentación de las cepas 6, 7, 10, 11, cp.



4.4.4 Evaluación sensorial

En la Tabla 4-8 se observan los resultados obtenidos a partir de la prueba sensorial por tres personas conocedoras del pan de abejas natural, el producto obtenido se muestra en la Figura 4-11.

Tabla 4-8: Resultados de la evaluación sensorial.

Cepa	Sabor	Olor	Aspecto
6	Agradable	Agradable	Agradable
7	Muy agradable	Muy Agradable	Agradable
10	Agradable	Agradable	Agradable
11	Agradable	Agradable	Agradable
Cp	Muy agradable	Agradable	Agradable
Cn	Desagradable	Desagradable	Desagradable

Figura 4-11: Pan de abejas *in vitro*.



Ninguno de los productos fue catalogado como poco agradable o como desagradable, para los concedores de las características sensoriales del pan de abejas.

5. Discusión

5.1 Aislamiento y selección de cepas de *Lactobacillus sp*

En la fase inicial correspondiente a la toma de muestras, se estableció que el pan de abejas es una muestra de difícil obtención, por su empaquetamiento, poca cantidad en las celdas, y bajo peso, por lo que fue necesaria la colecta de por lo menos treinta celdas para conformar una muestra.

Para la recuperación de *Lactobacillus*, el proceso de enriquecimiento microbiano se hizo en una relación de 4g para 36 ml de caldo de cultivo (MRS), ensayos previos indicaron la obtención de colonias similares utilizando mayor cantidad de muestra en volúmenes reducidos de medio líquido, siendo la mejor proporción la recomendada por Picozzi (2010) (4:36).

Las bacterias ácido lácticas del pan de abejas, fueron aisladas empleando el medio de cultivo MRS a 37°C en condiciones microaerofílicas con 48 - 72 h de incubación, tiempo establecido para el crecimiento del género *Lactobacillus*. La morfología hallada correspondió con la flora reportada para el pan de abejas [43], ya sea proveniente del néctar recolectado [45] y/o de origen gastrointestinal de las abejas [38, 131].

Por otro lado la presencia de otros grupos microbianos en el agar MRS, confirma la selectividad para las BAL y no la especificidad para el género *Lactobacillus*, debido a que en él se ha reportado la presencia de otros géneros como *Leuconostoc*, *Pediococcus* y de algunas Levaduras [23].

La suplementación con miel al 5% en el agar MRS, no le proporcionó ningún tipo de ventaja, sobre el agar MRS sin la adición de ningún suplemento, al efectuar comparaciones en la obtención de diferentes colonias en los dos agares no se obtuvo colonia alguna diferente a las obtenidas previamente, como tampoco un incremento en la población.

Las características macroscópicas de las 11 colonias elegidas, como el color blanco, la carencia de pigmentos, algunas especies con superficie brillante otras con superficie mate y todas convexas, corresponden con la descripción realizada por Kandler y Weiss en 1986; las mismas colonias sembradas en agar MRS con adición de azul de anilina al 0.3%, las mostraban de color azul propiedad asociada a las bacterias acidolácticas como las únicas que asimilan el colorante.

Según [61] las cepas sugestivas de *Lactobacillus* no deben poseer las enzimas catalasa y oxidasa, un criterio más para la exclusión probiótica, en estas pruebas bioquímicas el comportamiento de los aislados fue negativo para las dos enzimas.

5.2 Pruebas *in vitro* para potencial probiótico

Luego de obtener resultados microscópicos, macroscópicos y bioquímicos en el primer objetivo del proyecto, se dio comienzo con la evaluación probiótica de las once cepas, siguiendo los criterios establecidos por la FAO/OMS y los seguidos por [27, 46, 53, 59, 69, 78, 109, 137], este punto del estudio evaluó los once aislados en pruebas que se constituyeron como filtros de selección, con una identificación bioquímica y molecular final.

5.2.1 Tolerancia a pH ácido

La resistencia al pH bajo, es una de las propiedades requeridas en los microorganismos probióticos, su razón se debe al tránsito de los microorganismos deseables por el tracto gastrointestinal luego de haber resistido la alta acidez encontrada en el estómago [101], en este órgano, se tiene estimado que el tiempo de duración de la digestión es de tres horas y los valores de pH oscilan entre 2.0 -3.0 en algunos casos llegando hasta 1.0 [65], de igual manera se ha reportado a la cepa *L. acidophilus* M92 como no sobreviviente al pH 3.0 por más de 3h [86, 137], permitiendo establecer para esta prueba a las cepas como candidatas a probióticos, que deban cumplir con un tiempo de sobrevivencia de 3h en un pH de 3.0 simulando el tiempo de residencia en el estómago.

Según [114], la metodología que emplea el uso del HCl permite asemejar las condiciones *in vivo* en el estómago, ya que el HCl es conocido como un fuerte agente oxidante, con acción sobre importantes compuestos como los ácidos grasos, las proteínas y el ADN, inhibiendo directamente la actividad metabólica, desencadenando la reducción de la viabilidad de los probióticos.

A partir de la evaluación de la resistencia al pH ácido se evidenció que el 91% de los aislados sobrevivió al pH de 5.0, 4.0 y al mínimo establecido para la prueba de 3.0 después de las 2 y 4h de incubación; en los recuentos, las cepas 1, 2, 3, 5 y 8 presentaron los valores más bajos cercanos a valores de 10^5 UFC/ml y las cepas 6, 7, 9, 10 y 11 obtuvieron valores más altos cercanos a 10^6 UFC/ml, recuentos aceptados como mínimos luego de las exposiciones a este tipo de pruebas, 4 de ellas correspondiendo con las 4 mejores cepas finales que fueron identificadas molecularmente como *L. kunkeei*.

La cepa 4 creció en el pH 5.0 en las 2 y 4h de realizada la prueba y como pH mínimo para su desarrollo se encontró en el pH 4.0 para las 2 y 4h, no así fue su desempeño en el pH 3.0 donde no se obtuvo crecimiento en la lectura de las 2 y 4h, constituyéndose de esta manera como cepa no cumplidora de los requerimientos como probióticos.

Estos resultados permitieron visualizar cepas que pueden ser capaces de oponer resistencia al encuentro de los ácidos gástricos que se encuentran en el tracto gastrointestinal.

5.2.2 Crecimiento en bilis

Este es otro parámetro que evalúa directamente la sobrevivencia de las cepas en el ambiente hostil gastrointestinal al entrar en contacto con la bilis, referenciada con una concentración en el cuerpo humano no constante, pero aproximadamente de 0.3% (p/v), que al entrar en contacto con los microorganismos, afecta la homeostasis celular causando la disociación de la bicapa lipídica y de las proteínas integrales de la membrana celular, desintegramiento y permitiendo la salida del contenido citoplasmático originando la muerte celular [114].

El sometimiento de las cepas a concentraciones de bilis bovina comercial de 0.3%, 0.5% y 1.0%, permite la selectividad de los adecuados comportamientos frente a este inhibidor, observándose que el 73% de las cepas que corresponden a la 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10 y 11 fueron capaces de crecer en las tres concentraciones estudiadas 0.3%, 0.5% y 1.0%, en los tiempos de 2 y 4h; en los recuentos se observó que las cepas 2, 3 y 5 presentaron conteos cercanos a 10^5 UFC/ml, valor no convincente para esta prueba y las cepas 1, 6, 7, 10, 11 presentaron conteos cercanos a 10^6 UFC/ml, ajustándose en un requerimiento más como potencial probiótico. La cepa 1 no tuvo buen desempeño en medio ácido por lo que no fue opcionada para continuar en el estudio.

El porcentaje de crecimiento bacteriano en bilis de 73%, indica que en el pan de abejas existe un buen número de *Lactobacillus* resistentes, si se tiene en cuenta que algunas cepas de este género no crecen en presencia de sales conjugadas, por el contrario si haciéndolo en presencia de sales deconjugadas, probablemente por no poseer enzimas que hidrolicen sales conjugadas y aunque la bilis bovina comercial contiene los dos tipos de sales, las cepas nativas fueron capaces de crecer [78].

La cepa 4 en esta prueba fue incapaz de tolerar la bilis, sumado a que ya había demostrado su incapacidad de crecer en el pH ácido, por lo que se considera que no es una cepa probiótica, semejante a las cepas 8 y 9, que tampoco mostraron buenas características. Este resultado para algunas cepas era esperado debido a que en la fuente de origen no existe ningún compuesto similar a la bilis.

5.2.3 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica determinó la presencia de hemolisinas, presente en microorganismos potencialmente patógenos [4, 14, 77].

Los aislados 1, 3, 4 y 8, fueron colonias de las que no se obtuvo crecimiento, evitando de esta manera que este parámetro sea tenido en cuenta en la determinación como candidatas a probióticos, los aislados 2 y 9 presentaron α -hemólisis, característica eliminadora para la selección; y dentro del grupo microbiano del que se obtuvo crecimiento con una γ -hemólisis se ubican las cuatro cepas (6, 7, 10 y 11) que tuvieron los mejores comportamientos en las pruebas anteriores, junto con el aislado 5, esta variación en cuanto a capacidad hemolítica y de crecimiento en el agar Columbia con sangre, indica la presencia de diversas especies en el producto natural.

5.2.4 Actividad antibacteriana

El efecto antimicrobiano de las cepas ácido lácticas ha sido bien conocido, a través de la síntesis de productos inhibitorios como bacteriocinas, y de sustancias originadas como producto del metabolismo fermentativo, entre estos, ácidos orgánicos principalmente el ácido láctico. Este tipo de compuestos ejercen su acción frente a una amplia gama de microorganismos destacándose los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus* y Levaduras como *Candida* [60, 78, 109, 137, 139]; para efectos de este estudio se utilizaron cepas de referencia *S. aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* y *Bacillus* vs cepas nativas, evidenciándose el poder antagónico de las cepas nativas sobre el 75% de las cepas de referencia.

Acerca de la metodología empleada, se establece que la técnica de difusión en agar fue apropiada para evaluar de manera cualitativa y rápida la posible acción antimicrobiana ejercida por los aislados; como criterio de selección se estableció que como mínimo existiera efecto antibacteriano sobre tres de las cuatro cepas de referencia empleadas, comprobándose así su acción inhibitoria.

Los aislados 1, 3 y 9 no presentaron ningún tipo de acción antibacterial frente a las cuatro cepas de referencia, descartándose de esta manera la continuación en las siguientes pruebas; la cepa 2 ejerció efecto sobre el *S. aureus* con el valor de inhibición más bajo del estudio 7 (0.5), la cepa 8 únicamente ejerció efecto sobre la *P. aeruginosa* y la cepa 4 presento efecto sobre el 50% de las cepas de referencia el *S. aureus* y la *P. aeruginosa*.

El *S. aureus* y la *P. aeruginosa* fueron los microorganismos más vulnerables para los aislados, el 63.6% de las cepas nativas ejercieron algún tipo de efecto inhibitorio sobre estas; la *E. coli* fue inhibida por el 45.5% de las cepas nativas y el *B. subtilis* no fue inhibido por ninguna cepa nativa.

Estos resultados permitieron concluir que los aislados 5, 6, 7, 10 y 11 debían continuar con el proceso, indicando que las cepas correspondientes al *L. kunkeei* eran cepas con un interesante efecto antibacteriano frente a cepas patógenas comúnmente asociadas a patologías severas, además pueden actuar en casos de diarreas de origen bacteriano principalmente por *E. coli*, teniendo en cuenta que estas cepas superaron pruebas como la tolerancia al medio ácido y el crecimiento en bilis facilitando su tránsito por el tracto gastrointestinal, garantizando su llegada y su acción en contra de gérmenes patógenos.

Por otro lado, el *L. kunkeei* también es un posible microorganismo capaz de producir un efecto bioconservante en los alimentos, por intermedio de las sustancias antibacterianas que produce previniendo la contaminación que se puede generar; las cepas de referencia utilizadas en el presente estudio se relacionan con la calidad microbiológica de los alimentos [87, 95, 139], *S. aureus* actúa como indicador de contaminación higiénica de los manipuladores de alimentos, *E. coli* relacionada con la inadecuada manipulación y/o contaminación fecal y *P. aeruginosa* como bacteria aerobia psicrótrufa responsable del deterioro de los productos que se almacenan en refrigeración.

5.2.5 Susceptibilidad a los antibióticos

Dado que el 100% de los aislados sometidos a la prueba fueron resistentes al 57% de los antibióticos utilizados, el criterio de selectividad establecido fue escoger a cuatro cepas que fueran sensibles a la mayor cantidad de antibióticos posibles, de acuerdo a la FAO/OMS a través de su comunicado “No deberían utilizarse en alimentos bacterias que contengan genes transferibles de resistencia a medicamentos”.

En contraposición algunos autores [60, 78, 109] defienden el hecho de desear la resistencia a antibióticos de las cepas probióticas con el fin de asegurar su permanencia en el intestino después de un tratamiento terapéutico.

Para efectos de este estudio la posición adoptada está de acuerdo con lo establecido por la FAO/OMS, descartando al aislado 5, por ser de las cinco cepas, la más resistente a los antibióticos evaluados.

De los siete antibióticos probados, Gentamicina (CN), Tetraciclina (TE), Metronidazol (MTZ) y Enrofloxacin (ENR), no inhibieron el crecimiento de ninguno de los *Lactobacillus*, constituyéndose como un dato interesante a la hora de su selección como bacteria probiótica.

La cepa 7 fue la cepa más sensible a la mayor cantidad de antibióticos posibles, en este caso a tres (Trimetoprim sulfamida (SXT), Eritromicina (E), Amoxicilina (AML)).

Las cepas 6, 10 y 11 fueron sensibles a dos antibióticos Eritromicina (E) y Amoxicilina (AML); la sensibilidad del 100% de las cepas frente a este último antibiótico, tiene la ventaja de que la amoxicilina es uno de los antibióticos más ampliamente utilizados con o sin prescripción médica; además que correlaciona con los datos de sensibilidad que se tienen de los Lactobacilos, ya que el género es sensible a las penicilinas y a los inhibidores de la síntesis de proteínas como la eritromicina [1, 3, 60, 87].

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba, se sugiere que el *L. kunkeei* (cepas 6, 7, 10 y 11) proporciona una doble ventaja en cuanto a su permanencia y eliminación, ya que protege el equilibrio de la flora residente durante el uso de algunos antibióticos usados comúnmente, como en casos de enfermedades diarreicas, y son eliminados por otros antibióticos evitando la transmisión de posibles plásmidos de resistencia a cepas potencialmente patógenas del intestino.

5.3 Identificación bioquímica y molecular de las cepas

5.3.1 Identificación bioquímica

Esta identificación permitió establecer la similitud en el comportamiento fermentativo del *L. kunkeei* con referencia al *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii* y con respecto al *Lactobacillus fructivorans*, según el sistema API®50 CHL.

Las cepas 6, 7, 10 y 11 con una confiabilidad entre el 81.4 – 85.2%, fueron identificadas como *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii* y con una confiabilidad entre el 70.8 - 76.1% fueron identificadas como *Lactobacillus fructivorans*.

El sistema API®50 CHL identifica solamente 27 especies de *Lactobacillus* de 207 existentes [70], por lo que ubico a las cepas de estudio en especies de *Lactobacillus* con comportamientos fermentativos similares, de esta manera se estableció que el sistema API®50 CHL identifica a las especies presentes en su base de datos y no puede utilizarse para identificar otros microorganismos ni para excluir su presencia.

El *Lactobacillus kunkeei* es un fermentador de glucosa, fructosa y sacarosa, su similitud con el *Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii* radica en que este último, también fermenta glucosa, fructosa y sacarosa además de fermentar galactosa y manosa; y la similitud con el *Lactobacillus fructivorans*, radica en que los dos fermentan glucosa y fructosa, como se observa en la Tabla 5-1, a través de los patrones de fermentación, basados en la tabla de identificación del sistema API®50 CHL.

5.3.2 Identificación molecular

De acuerdo con [55], estudios basados sobre comparativos de análisis de secuenciación de ADN ribosomal (ADNr) 16S, demostraron que algunos taxones generados sobre la base de características fenotípicas no corresponden con las relaciones filogenéticas sugeridas, así algunas especies no son fácilmente distinguibles por características fenotípicas, de esta forma las técnicas moleculares incluyendo la PCR se han vuelto indispensables para la identificación de especies de *Lactobacillus* o para la diferenciación de las cepas probióticas.

A través de la extracción del ADN, se evidenciaron inconvenientes en el empleo del método de ebullición de colonia (colony-PCR), técnica que funciona adecuadamente en las especies bacterianas, sin embargo, en este caso fue difícil o imposible obtener amplificación con el ADN generado por esta técnica, por esta razón se optó por el método enzimático, procedimiento que permitió obtener ADN genómico de alta calidad y pureza, apto para la amplificación por PCR.

La técnica empleada, en este caso la PCR fue oportuna y precisa al orientar la identificación, ya que la caracterización por pruebas bioquímicas previas, nos indicaba un nombre y una especie errónea, según [131], el *L. kunkeei* se encuentra filogenéticamente relacionado con especies como *L. kefir*, *L. vermifirme*, *L. pentosus*, no siendo tan cercano con el *L. delbrueckii ssp delbrueckii* y con el *L. fructivorans* indicados por el sistema API®50 CHL.

Acerca del *Lactobacillus kunkeei*, se conoce su participación como microorganismo causante del deterioro de los vinos en una investigación realizada por [28], y como parte de la flora encontrada en el Tracto Gastrointestinal de la abeja *Apis dorsata* [131]; características como potencial probiótico y comportamiento fermentativo, se establecieron en el presente estudio.

Tabla 5-1: Patrones de fermentación de carbohidratos (tomado del sistema API®50 CHL).

Cepa	Carbohidratos																																	
	Control	Glicerol	Eritritol	D-arabinosa	L-arabinosa	D-ribosa	D xilosa	L-xilosa	D-adonitol	D-galactosa	D-glucosa	D-fructosa	Lactosa	Sacarosa	Amigdalina	Rhamnosa	Celobiosa	Esculina	D-mannosa	Gluconato	Maltosa	Manitol	Manosa	Rafinosa	Salicina	Sorbitol	Dulcitol	Trehalosa	Melibiosa	Almidón	Glicógeno	Tagatosa	Arabitol	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	d	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-

1. *L. delbrueckii ssp delbrueckii*

2. *L. kunkeei*

3. *L. fructivorans*

5.4 Fermentación de polen

Se emplearon los cuatro aislados identificados molecularmente como *Lactobacillus kunkeei*, previamente caracterizados como potenciales probióticos, debido a que su comportamiento fue diferente en las cinco pruebas anteriormente descritas y como cepa control se utilizó el *Lactobacillus acidophilus*.

5.4.1 Comportamiento del pH y la acidez

Según estudios de [12, 123, 129], el comportamiento general del pH y de la acidez en estas valoraciones, fue el característico de una fermentación, notándose el descenso del pH con el consecutivo aumento de la acidez; con respecto al pH, el análisis estadístico indicó que el efecto de la adición de las cepas y el efecto del tiempo de fermentación sobre el descenso del pH fue significativo, por la interacción de las cepas y del tiempo ($p < 0.05$), el descenso de las cuatro cepas fue similar en comparación con el obtenido por el *L. acidophilus*, sin embargo se destacó el comportamiento de la cepa 11, en la que su curva de descenso mostró un comportamiento casi igual al del control positivo al cabo de las 36h.

Para todas las cepas se concluyó que la fase de crecimiento y desarrollo exponencial está indicado hasta las 12h, en el transcurso de las 24 a las 36 h no se evidenció cambios significativos en el descenso del pH.

Con respecto a la acidez libre, el análisis estadístico indicó que el efecto de la adición de las cepas y el efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de acidez fue significativo ($p < 0.05$), evidenciándose que la mayor producción de la acidez estuvo a cargo de la cepa 10, con 142 meq/kg caracterizándose su curva por una producción progresiva, como la producción obtenida por las cepas 6 y 7 incluyendo el *L. acidophilus* del que se obtuvo una acidez de 98 meq/kg, al cabo de las 36h de fermentación, la cepa 11 mostró un comportamiento en que la acidez se incrementó hasta las 24h de fermentación y en las siguientes 12h mostró un ligero descenso.

Con relación al control negativo, se observó un aumento de acidez libre de 43.88 meq/kg a las 36 h y de descenso de pH de 4.92 estos hallazgos son similares a los descritos por [35, 36] en estudios fermentativos previos llevados a cabo en polen, esta variación en el pH y en la acidez no son atribuibles al metabolismo bacteriano, sino a las actividades químicas propias del sustrato, posterior al proceso térmico.

Aunque las cepas utilizadas de *Lactobacillus kunkeei* (6, 7, 10 y 11) y de *Lactobacillus acidophilus* A-1, generaron un incremento en la población con un máximo descenso en el pH de 4.3 logrado por la cepa 10, y de 4.4 para el *L. acidophilus*, no se alcanzó al valor que presenta el pan de abejas natural referenciado por [35] de 4.1; similar fue el caso de la acidez, en el producto fermentado su valor total fue de 263 meq/kg, siendo superado por el pan de abejas natural cuyo alimento registra un valor de 271 meq/kg [35].

5.4.2 Recuento celular de las BAL

Se pudo establecer el crecimiento del *L. acidophilus* como el más óptimo, en la matriz de fermentación de polen, presentando recuentos más altos en comparación con todas y cada una de las cepas nativas, sus recuentos estuvieron alrededor de 10^8 UFC/g, cumpliendo con la cantidad deseada para probióticos establecida por la FAO/OMS, en el tiempo 36h su conteo descendió a 10^7 UFC/g, concordando con la alta acidez presentada en el sustrato; en el caso de las cepas nativas los conteos fueron similares entre ellos, estuvieron alrededor de 10^7 UFC/g.

Los resultados obtenidos señalan que 12 horas, es el tiempo adecuado para que se dé una fermentación óptima por parte del *L. acidophilus*, tiempo similar establecido en los estudios de [35, 36], suficiente para inducir una producción significativa de acidez y un descenso significativo en el pH, conservando un número deseable de células viables; para el *L. kunkeei* también se establece un tiempo de 12 horas, para llevar a cabo un proceso fermentativo, con una producción significativa de acidez y un descenso significativo en el pH, no aplicando así el recuento de células viables, ya que estuvo alrededor de 10^7 UFC/g, evidenciándose como un recuento más bajo en comparación con el *L. acidophilus*.

Este hallazgo permite visualizar al *L. kunkeei* como una cepa prometedora industrialmente, ya que su desempeño no está muy distante del presentado por el *L. acidophilus*, teniendo en cuenta que esta última, pertenece al grupo de las cepas reconocidas como probióticas empleadas en la industria, cepas que probablemente han sido sometidas a distintos procesos biotecnológicos con el fin de obtener mejores rendimientos.

5.4.3 Evaluación sensorial

Para el efecto del proyecto, se demostró que las cepas correspondientes al *L. kunkeei* fueron capaces de fermentar adecuadamente el sustrato de polen, sin evidenciar ningún tipo de alteración física que afectara el aspecto, el color, el olor y el sabor; de acuerdo al concepto emitido por las personas conocedoras del pan de abejas, el producto obtenido se tornó interesante, el concepto para los tres en cuanto al pan de abejas con la cepa 6, 10 y 11 fue de agradable para el sabor, el olor y el aspecto; el pan de abejas con la cepa 7 recibió el concepto de muy agradable para el sabor y el color, y agradable para el aspecto; y la percepción con respecto al pan de abejas inoculado con la cepa *L. acidophilus* fue de agradable para el sabor, el olor y el aspecto.

Las características que adquiere el pan de abejas, después de la inoculación con cualquiera de las cepas del *L. kunkeei*, se establecen como aceptables para su aplicación industrial.

Este parámetro de evaluación, para los productos fermentados, permitió obtener una ligera aproximación a la elaboración de una prueba organoléptica, no desarrollada satisfactoriamente, debido a las desventajas para su realización, como la limitación en el número de personas conocedoras del pan de abejas para constituir un panel de expertos y la inexistencia de parámetros estandarizados de evaluación sensorial en este producto.

Los productos fermentados aportan innumerables beneficios en la salud de los consumidores, con base en su adecuada manipulación, se asegura la calidad higiénica y la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos, así como la incorporación de microorganismos favorecedores del equilibrio de la microflora intestinal; la obtención de alimentos apícolas fermentados, es una ventaja no solamente visto desde el punto de vista en salud humana y animal, sino también como avance en el desarrollo tecnológico, económico y social para los apicultores colombianos.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

La literatura en torno al *L. kunkeei* es limitada, existen pocas investigaciones acerca de él, y se asocia a vinos donde ocasionan un deterioro en el sabor; de manera que esta tesis se constituyó como un importante reporte de asociación de este microorganismo al pan de abejas, ya que no se encuentran referencias bibliográficas con respecto a este aporte.

La caracterización de las cuatro cepas genera mayor conocimiento con respecto a esta especie en cuanto a su morfología, comportamiento bioquímico, fermentativo y a las propiedades como potencial probiótico.

Se hace necesario destacar que todas las cepas aisladas a partir de la fuente natural como el pan de abejas, deben ser evaluadas individualmente, en este estudio se encontraron diferencias en comportamientos en cepas identificadas molecularmente con la misma denominación taxonómica.

El principal microorganismo fermentador cultivable del pan de abejas perteneciente al género *Lactobacillus* es el *L. kunkeei*, además el que presentó mejores comportamientos en las pruebas evaluadas, con mayor resistencia y sobrevivencia a la manipulación en el laboratorio.

Las pruebas de Actividad hemolítica y Actividad antibacteriana son concluyentes en la selectividad de BAL candidatas a probióticos, mientras que pruebas como la susceptibilidad a antibióticos son clasificatorias.

El *L. kunkeei* es un microorganismo que presentó propiedades de resistencia a condiciones hostiles como el medio ácido y la presencia de sales biliares, que posee capacidad antagónica frente a cepas conocidas por su patogenicidad y que fue sensible a dos antibióticos de uso rutinario en la medicina como la eritromicina y la amoxicilina.

El *L. kunkeei* produce fermentaciones con niveles considerables de acidez y causa un buen descenso del pH, las células viables presentaron conteos ligeramente inferiores a los resultados obtenidos con el *L. acidophilus*. Sin embargo, en estudios posteriores las cepas obtenidas son susceptibles al mejoramiento en cuanto a su viabilidad.

Se establece que el *L. acidophilus* A-1, conocido también como NCFM de Danisco®, es un buen microorganismo para la elaboración de pan de abejas industrial por su rápida adaptabilidad al medio, por los conteos presentados en cada hora evaluada, siendo de la cantidad deseada de 10^8

UFC/g, aunque los valores de pH y acidez no fueron los mejores en comparación con las otras cepas, las cantidades producidas son significativas para lograr un buen producto.

La aplicabilidad en la apicultura del *L. kunkeei*, no solamente se relaciona con su origen sino también, con las ventajas que aportaría a nivel productivo, es conocido que el alimento básico de las larvas de las abejas es el producto fermentado del polen, al obtener un pan de abejas *in vitro* con probióticos además de proveer los nutrientes necesarios, también aportaría los múltiples beneficios de estos microorganismos, como el fortalecimiento del sistema inmune, disminuyendo la posibilidad de contraer enfermedades.

En la actualidad se desea, sustituir la terapia antibiótica por la terapia preventiva grupo al que pertenecen los microorganismos probióticos, debido a que el efecto de su consumo sería menos agresivo en comparación con los efectos de los antibióticos, esta ha sido una de las premisas para que la industrias farmacéutica y alimentaria deseen investigar a este tipo de bacterias, aislándolas de fuentes no comunes, producirlas a nivel escala industrial e incorporarlas en la dieta humana y animal, el *L. kunkeei* es un ejemplo de microorganismo atrayente para estos sectores, ya que fue aislado de una fuente no común, y es poseedor de características probióticas interesantes.

El objetivo de cualquier proceso biotecnológico es utilizar toda la tecnología disponible para la producción de microorganismos o cualquier producto de interés industrial, que sea económicamente rentable y a partir del cual se pueda generar algún tipo de beneficio en la salud y en la economía. Para lograr este propósito en la apicultura, resulta necesaria la optimización del proceso para la producción de pan de abejas tipo industrial y/o del *L. kunkeei*, el conocimiento profundo del microorganismo y de los sustratos a utilizar como el polen, a fin de obtener un producto con los mas altos estándares de calidad con rendimientos incrementados en la salud, en la economía y en el posicionamiento en el mercado nacional e internacional.

6.2 Recomendaciones

Caracterizar la flora acompañante del *Lactobacillus kunkeei*, principalmente las bacterias correspondientes a cocos Gram positivos que podrían ser BAL y las levaduras, de esta forma establecer su importancia en el proceso fermentativo.

Realizar estudios más profundos en el *Lactobacillus kunkeei*, microorganismo con comportamientos interesantes para este estudio y con más propiedades por descubrir e investigar, como las relacionadas con su capacidad para inhibir el crecimiento de cepas patógenas.

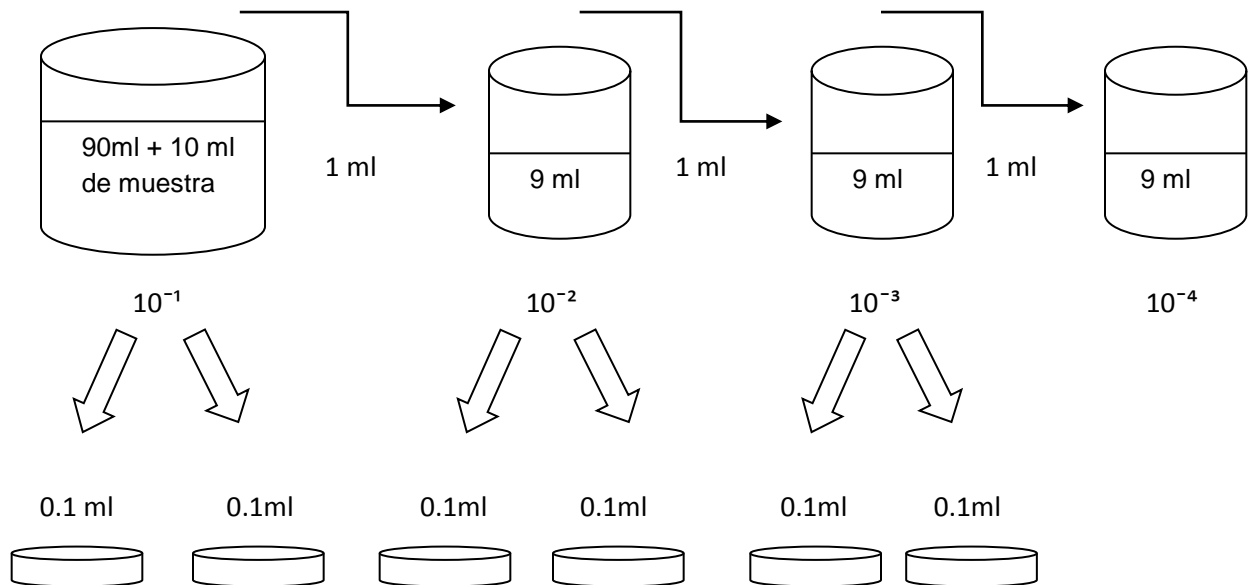
Ampliar el perfil de evaluación del *L. kunkeei* como potencial probiótico, incluyendo pruebas como adhesión celular, actividad antioxidante, efecto inmunomodulador entre otras y pasar a la siguiente fase de selección a través de la experimentación *in vivo*.

Realizar estudios para establecer el tiempo de vida útil del producto, con el fin de ajustarlo a las condiciones deseadas para su comercialización.

Generar ensayos en alimentos, para la obtención de materia prima con incorporación de *L. kunkeei*, a fin de constituirse en la base hacia el desarrollo de productos funcionales.

A. Anexo: Procedimiento para realizar recuentos

- Montar diluciones 1:10 con solución salina fisiológica estéril pH 7.0 ó agua peptonada
- Homogeneizar las diluciones



- Sembrar 0.1 ml por cada dilución a estudiar, por duplicado
- (Por cada serie de diluciones montar una réplica)
- Extender muy bien en toda la superficie del agar.
- Incubar a la temperatura correspondiente.
- (*Lactobacillus* – Anaerobiosis 37 ° /24-48-72 h)
- (Levaduras –Aerobiosis 25-28 °C/72 h)
- Después de la incubación, realizar los conteos
- Tener en cuenta las diluciones que presentan conteos entre 10 y 300 colonias
- Aplicar la fórmula para establecer el número de UFC/ml:

Σ colonias

$$(n1 \times 1) + (n2 \times 0.1) + (n3 \times 0.01) d$$

Donde

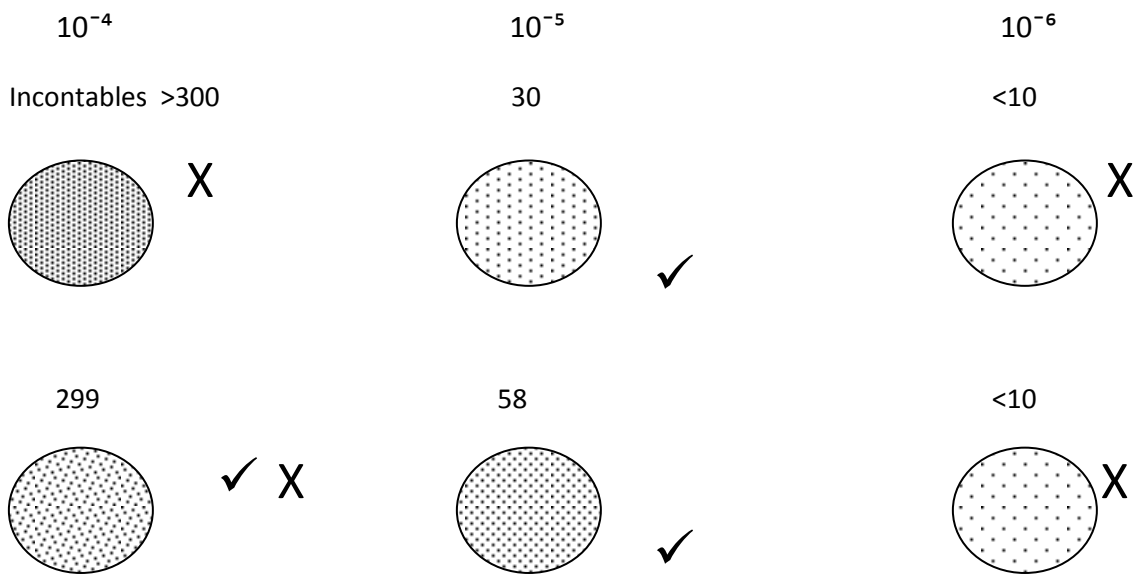
n1: Número de placas de la primera dilución que presenta un conteo en el rango establecido

n2: Número de placas de la segunda dilución

n3: Número de placas de la tercera dilución

d: Primera dilución considerada

Ejemplo para un conteo de:



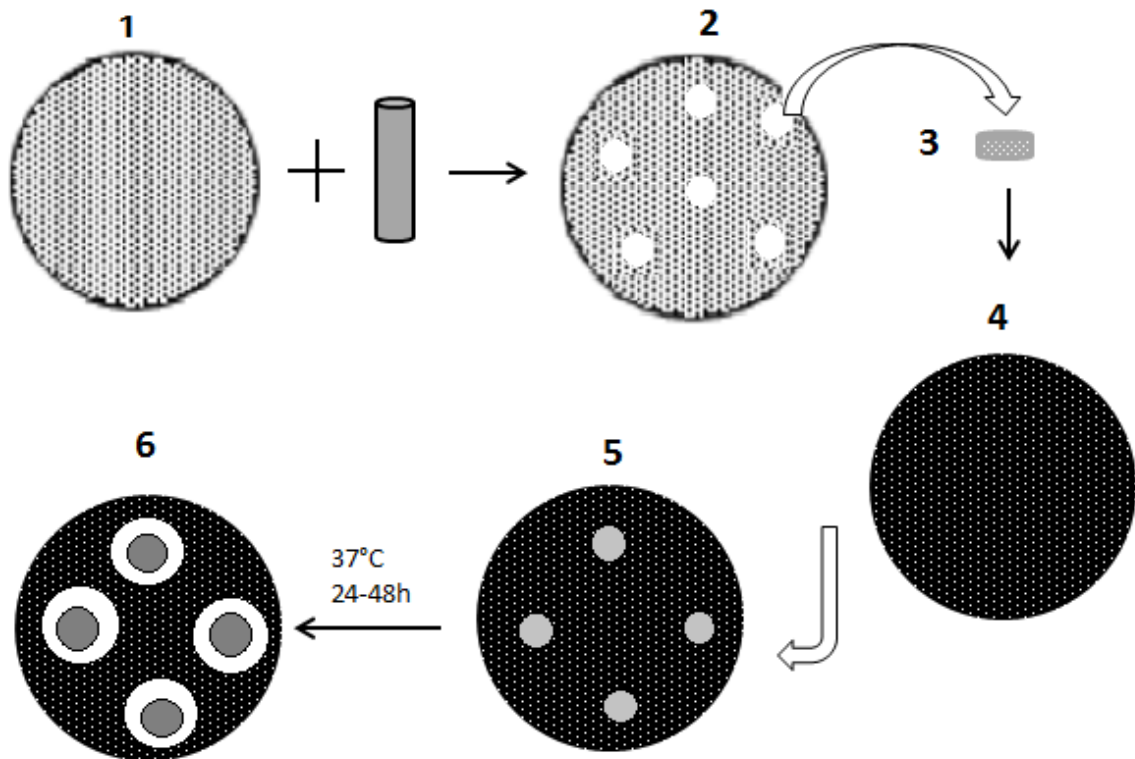
Σ colonias

$$(n1 \times 1) + (n2 \times 0.1) + (n3 \times 0.01) d$$

$$\frac{58+30+299}{(1 \times 1) + (2 \times 0.1)} = \frac{387}{1.2 \times 10^{-4}} = 322.5 \times 10^4 = 3.2 \times 10^6$$

Adaptado de [102, 103]

B. Anexo: Actividad antimicrobiana



1. Cultivo de *L. kunkeei*
2. Extracción de cilindros
3. Cilindro con *L. kunkeei*
4. Cultivo con la cepa de referencia
5. Cultivo con los cilindros superpuestos
6. Identificación de halos de inhibición del *L. kunkeei* sobre la cepa de referencia

C. Anexo: Cuantificación de microorganismos por el método de Miles y Misra

1. Con un marcador dividir la parte externa inferior de las cajas en seis sectores.

2. Marque tres sectores de una caja con la dilución 10^5 y los otros tres con 10^6 , tres sectores de la segunda caja con la dilución 10^7 y los otros tres sectores con 10^8 .

3. Con una pipeta Pasteur, tomar una muestra de la dilución 10^8 , colocar la pipeta en posición vertical y a una altura aproximada de 2 cm sobre la superficie del medio de cultivo, dejar caer una gota en el centro de cada uno de los tres sectores que corresponden a una dilución.

4. Con otra pipeta inocular por triplicado la dilución 10^7 en los otros tres sectores, cuidando de colocar la pipeta en cada ocasión en posición vertical y a la altura indicada.

5. Inocule la segunda caja con las diluciones 10^6 y 10^5 .

6. Dejas que las gotas absorban el medio, invertir las cajas e incubar a la temperatura y durante el tiempo adecuado para los microorganismos que se desea cuantificar.

7. Después de la incubación, seleccionar los sectores que presenten entre 20 y 30 colonias y proceder a la cuantificación de las mismas.

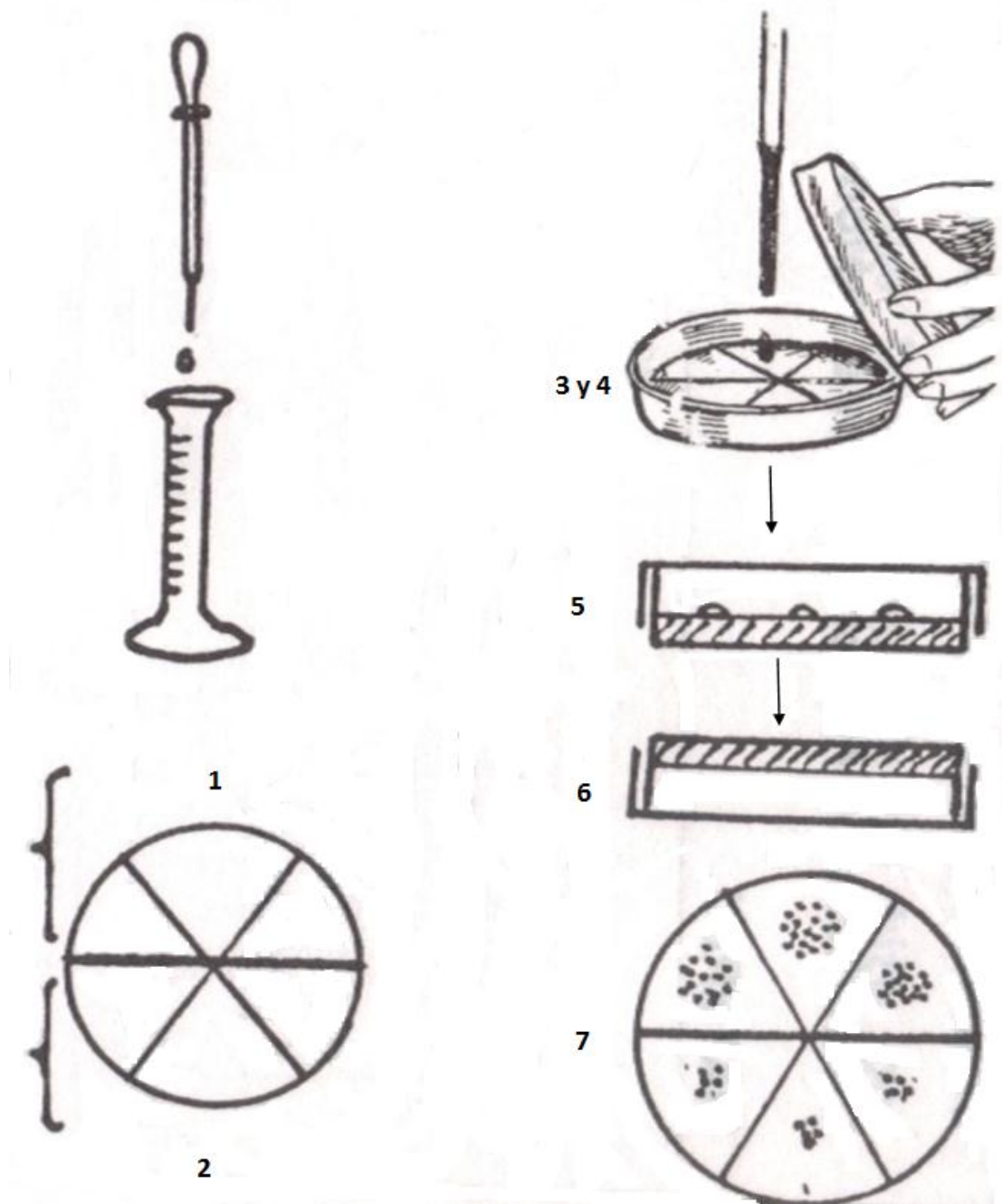
8. Calcule el número de bacterias /ml o g de la muestra con la siguiente fórmula

$$\text{Número de bacterias por ml} = \frac{N \times f}{V}$$

En donde **N** = Número promedio de colonias.

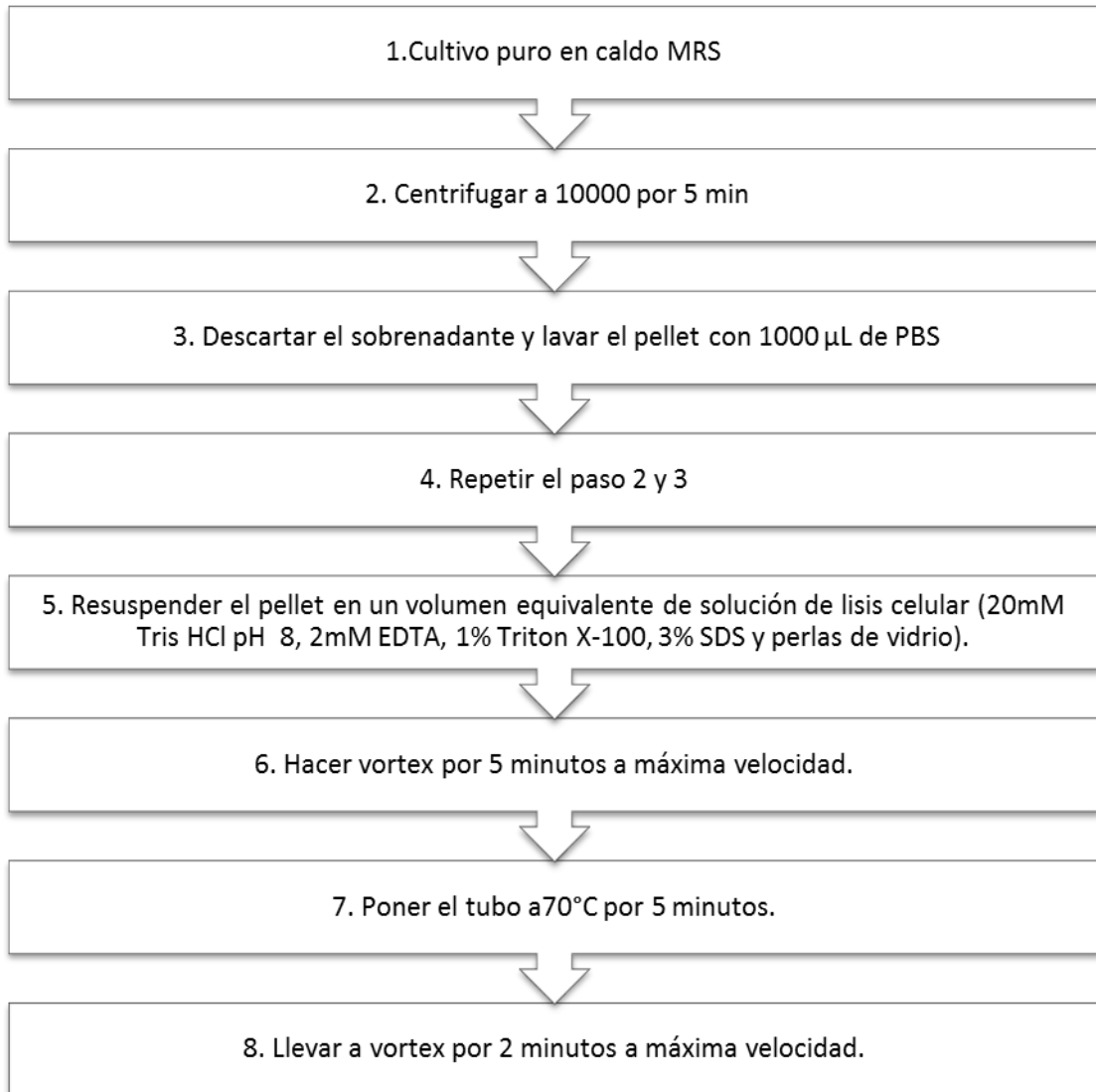
f = Inverso del factor de dilución.

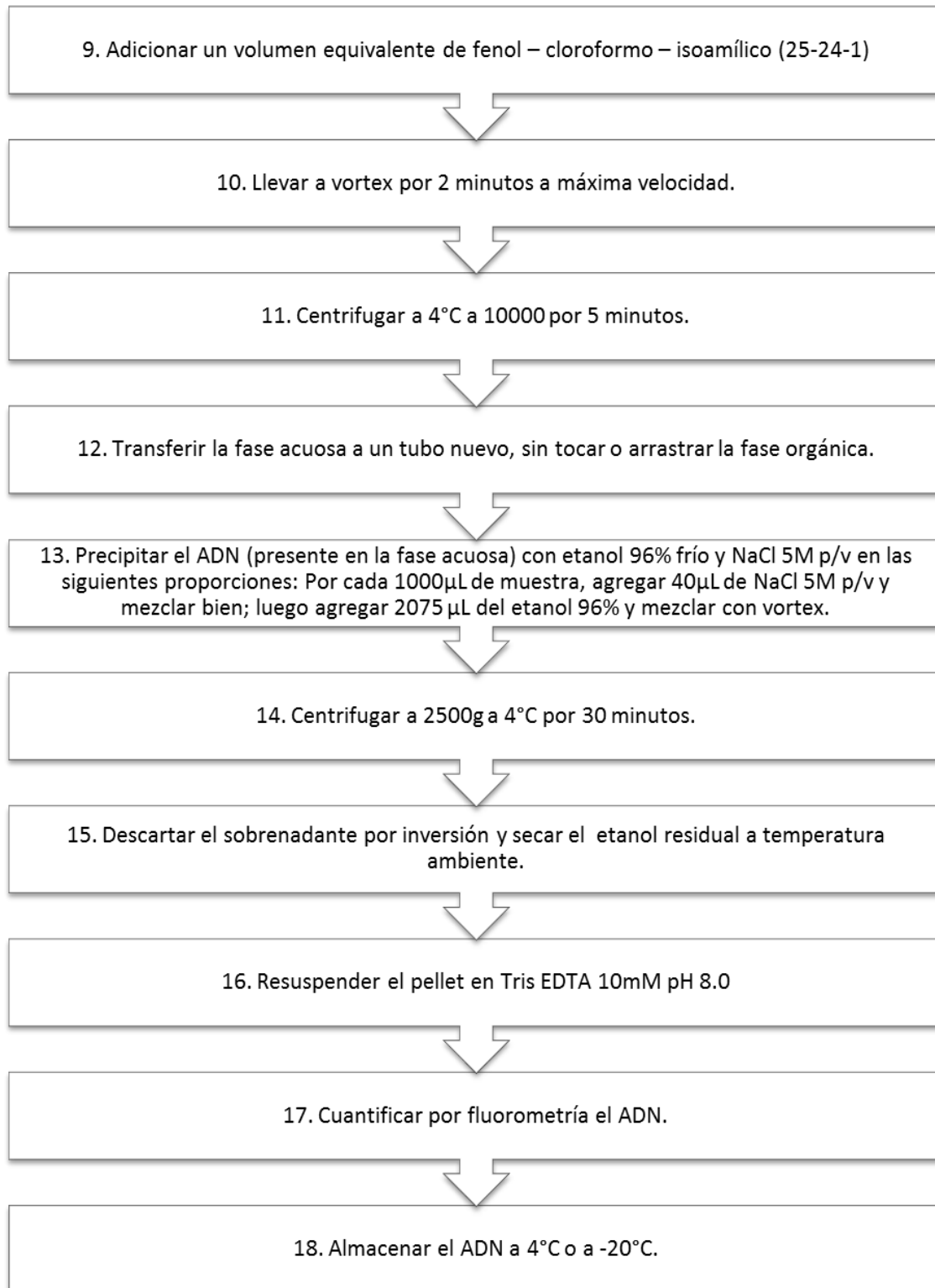
V = Volumen de la gota.



Tomado de [83].

D. Anexo: Extracción de ADN





E. Anexo: Identificación molecular

L1 con 27 F (50 a 330)

TTTTATGCTTGCATAAATGATTTTTGGATTCCGGAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
 GCCCCGAAGCGGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAATTAGTTGGAACCGCATGGTTC
 CAACTTGAAAGATGGCTCTGCTATCACTTTGGGATGGACCCGCGCCGTATTAGTTAGTTGGTGAGATAAAA
 GCCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB498042.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-1	520	520	100%	2e-144	100%
AB498039.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F7-2	520	520	100%	2e-144	100%
AB559822.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0778	520	520	100%	2e-144	100%
AB559821.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0777	520	520	100%	2e-144	100%
AB559820.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0776	520	520	100%	2e-144	100%
AB498043.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-2	520	520	100%	2e-144	100%
GQ451608.1	Lactobacillus kunkeei strain Taj Arash-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	100%	2e-144	100%
EU753691.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	520	520	100%	2e-144	100%
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial	520	520	100%	2e-144	100%

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
	sequence					
L1 con 1492 r (50 a 331)						
GTCCTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACGTATTCACCGT GGCATGCTGATCCACGATTACTAGTGATTCCAATTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGA GAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTTTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTG TAGCCCAGCTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGTTTATCACCGGCAGTC						
Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB498042.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-1	521	521	100%	7e-145	100%
AB498040.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F10-3	521	521	100%	7e-145	100%
AB559822.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0778	521	521	100%	7e-145	100%
AB559821.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0777	521	521	100%	7e-145	100%
AB559820.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0776	521	521	100%	7e-145	100%
AB559819.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: IWBT B227	521	521	100%	7e-145	100%
AB559818.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: IWBT B226	521	521	100%	7e-145	100%
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	100%	7e-145	100%

L2 con 27f (50 a 330)

TTTATGCTTGCATAAATGATTTTTGGATTCCGGAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
 CCCCAGAGCGGGGATAACATTTGGAAACAAGTGCTAATACCGCATAATTAGNTGGAACCGCATGGTTCC
 AACTTGAAAGATGGCTCTGCTATCACTTTGGGATGGACCCGCGCCGTATTAGTTAGTTGGTGAGATAAAAG
 CCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
AB498042.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-1	516	516	100%	3e-143	99%
AB498039.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F7-2	516	516	100%	3e-143	99%
AB559822.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0778	516	516	100%	3e-143	99%
AB559821.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0777	516	516	100%	3e-143	99%
AB559820.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0776	516	516	100%	3e-143	99%
AB498043.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-2	516	516	100%	3e-143	99%
GQ451608.1	Lactobacillus kunkeei strain Taj Arash-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	516	516	100%	3e-143	99%
EU753691.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	516	516	100%	3e-143	99%
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	516	516	100%	3e-143	99%

L2 con 1492r (50 a 330)

TCTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACGTATTCACCGTG
 GCATGCTGATCCACGATTACTAGTGATTCCAACCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAG
 AATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTTTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTA
 GCCAGCTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCT

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB498042.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-1	521	521	100%	7e-145	100%
AB498040.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F10-3	521	521	100%	7e-145	100%
AB559822.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0778	521	521	100%	7e-145	100%
AB559821.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0777	521	521	100%	7e-145	100%
AB559820.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0776	521	521	100%	7e-145	100%
AB559819.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: IWBT B227	521	521	100%	7e-145	100%
AB559818.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: IWBT B226	521	521	100%	7e-145	100%
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	521	521	100%	7e-145	100%

L4 con 27 F (70 a 370)

```
AAATGATTTTTGGATTCGGAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCCGAAGCGG
GGGATAACATTTGAAACAAGTGCTAATACCGCATAATTAGTTGGAACCGCATGGTTCCAACCTGAAAGAT
GGCTCTGCTATCACTTTGGGATGGACCCGCGCCGTATTAGTTAGTTGGTGAGATAAAAGCCCAAGACG
ATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
```

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AB498042.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-1	558	558	100%	5e-156	100%
AB498039.2	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F7-2	558	558	100%	5e-156	100%

Accession	Description	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
AB559822.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0778	558	558	100%	5e-156	100%
AB559821.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0777	558	558	100%	5e-156	100%
AB559820.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NRIC 0776	558	558	100%	5e-156	100%
AB498043.1	Lactobacillus kunkeei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: F20-2	558	558	100%	5e-156	100%
GQ451608.1	Lactobacillus kunkeei strain Taj Arash-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	558	558	100%	5e-156	100%
EU753691.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	558	558	100%	5e-156	100%
EF187239.1	Lactobacillus kunkeei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	558	558	100%	5e-156	100%

F. Anexo: Ficha técnica del cultivo liofilizado comercial Lb acidophilus Danisco®

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 1 / 2

Valid from: February 10, 2009

DANISCO

First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 223810-2.0EN

Material no. 1248156

HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU
HOWARU™ Premium Probiotics

Description

Freeze-dried concentrated probiotic culture for dairy and beverages applications.

Directions for use

Disinfect opening area with ethanol (approx. 70 %) before opening package. Cut open and add culture to process milk under aseptic conditions. We do not accept any liability in case of undue application.

Composition

Lactobacillus acidophilus NCFM®

Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods

Examination of culture:

Cell count:	$\geq 1.0E+11$ / DCU
non-lactic acid bacteria	< 100 / g [UM-030]
enterobacteriaceae	< 1 / g [UM-031]
yeasts and moulds	< 10 / g [UM-017]
enterococci	< 10 / g [UM-033]
Staphylococcus aureus	< 1 / g [UM-034]
Bacillus cereus*	< 10 / g [UM-041]
salmonellae*	neg. / 25 g [UM-038]
listeria*	neg. / 25 g [UM-039]

* not necessarily examined for each lot, but ensured by HACCP system as well as by plant and personnel hygiene.

Storage

18 months from date of production at ≤ -18 °C
6 months from shipment date at + 4°C

Packaging

PE, PET, Al laminated foil

Purity and legal status

HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU meets the specification laid down by the EU legislation.

Label food regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

Safety and handling

MSDS is available on request.

Kosher status

Dairy Kosher

Halal status

certified by Islamic Food Council of Europe

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 2 / 2

Valid from: February 10, 2009

DANISCO

First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 223810-2.0EN

Material no. 1248156

HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU
HOWARU™ Premium Probiotics

Allergens

Below table indicates the presence of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	wheat	
	X	other cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans	
X		milk (including lactose)	
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	
	X	lupin	
	X	molluscs	

Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

Additional information

The values indicated in this document correspond to results from standardized laboratory tests. They should be considered as guidelines. In practice, other values are expected depending on the type of product and technology. Due to advances in technology and continuous product improvement it may be necessary to change standard values in the future.

GMO status

HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

G. Anexo: Estadística

Análisis de varianza para PH

```
ajuste=av(respuesta~cepa.f+tiempo.f+cepa.f*tiempo.f,data=ph)
```

```
>summary(ajuste)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
cepa.f	5	0.6963	0.1393	20.630	5.57e-08 ***
tiempo.f	3	2.5216	0.8405	124.526	9.17e-15 ***
cepa.f:tiempo.f	15	0.5466	0.0364	5.399	0.000136 ***
Residuals	24	0.1620	0.0068		

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>ajuste$assign
```

```
[1] 0 1 1 1 1 1 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
```

Terms:

	cepa.f	tiempo.f	cepa.f:tiempo.f	Residuals
Sum of Squares	0.6962500	2.5216417	0.5466333	0.1620000
Deg. of Freedom	5	3	15	24

```
Residual standard error: 0.08215838
```

Análisis de varianza para Acidez

```
>ajuste=aov(respuesta~cepa.f+tiempo.f+cepa.f*tiempo.f,data=basedatos)
```

```
>summary(ajuste)
```

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
cepa.f	5	7439	1488	4.32 0.00605 **
tiempo.f	3	60609	20203	58.67 3.39e-11 ***
cepa.f:tiempo.f	15	8059	537	1.56 0.16067
Residuals	24	8265	344	

```
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
>ajuste$assign
```

```
[1] 0 1 1 1 1 1 2 2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3
```

```
Call:
```

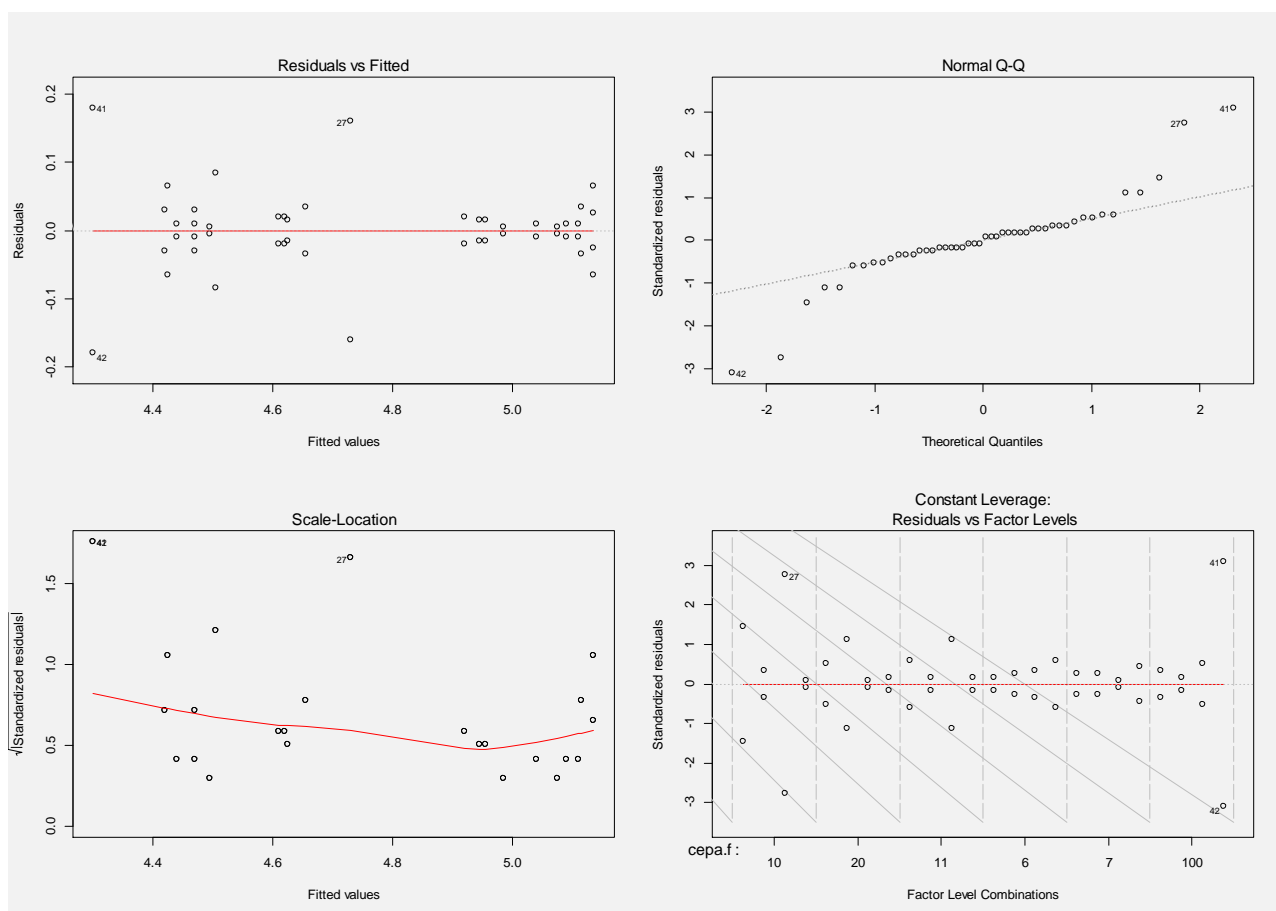
```
aov(formula = respuesta ~ cepa.f + tiempo.f + cepa.f * tiempo.f,
data = basedatos)
```

```
Terms:
```

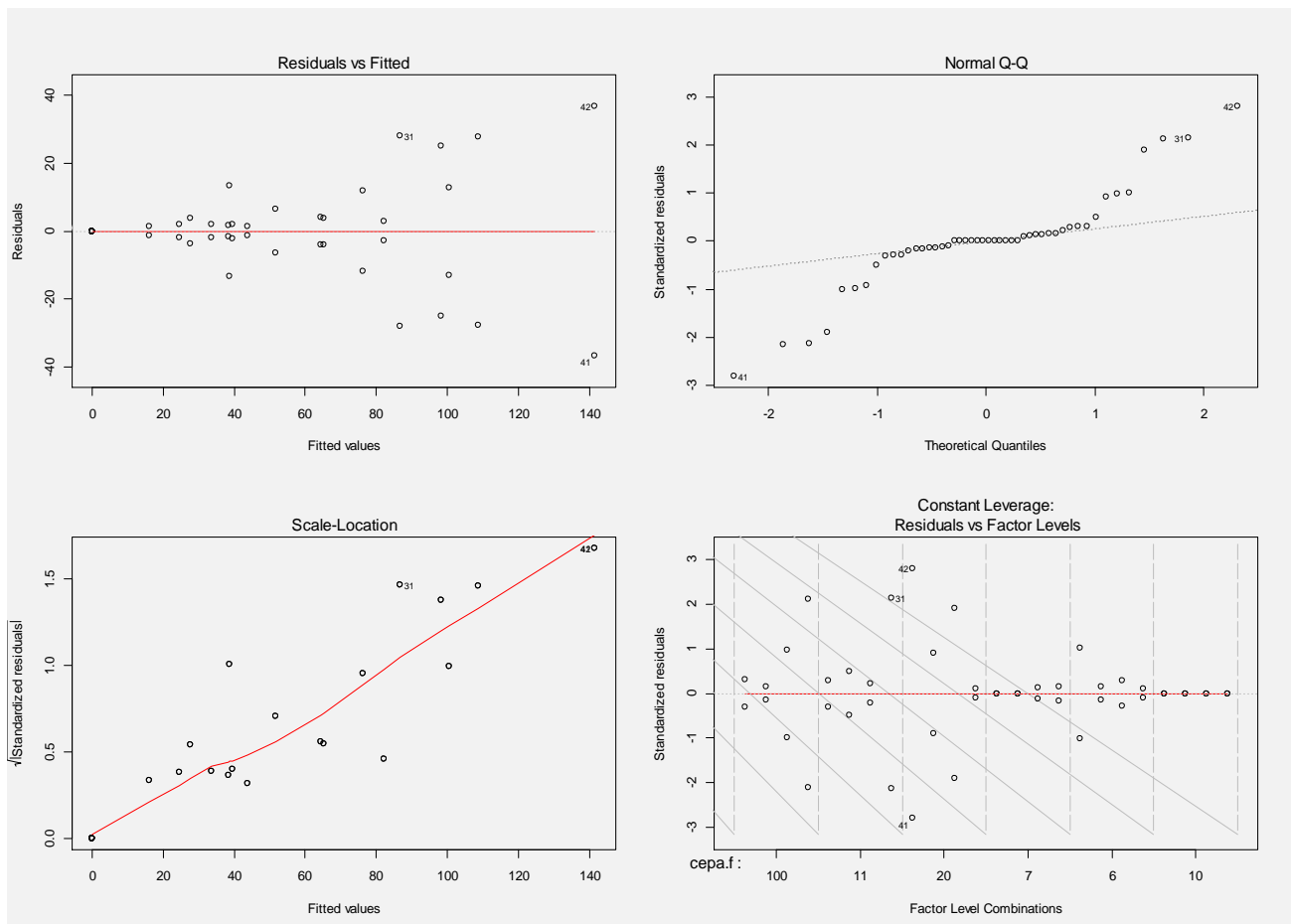
	cepa.f	tiempo.f	cepa.f:tiempo.f	Residuals
Sum of Squares	7438.65	60609.11	8059.06	8264.73
Deg. of Freedom	5	3	15	24

```
Residual standard error: 18.55705
```


Gráficas de residuos para pH



Gráficas de residuos para Acidez



Bibliografía

1. Alvarado, C; Díaz, C. 2009. Estudio preliminar del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. Revista de la Facultad de Farmacia 51 (1):8-14.
2. Álvarez, J. 1997. La utilización de los productos apícolas. En: Zootecnia. Bases de la producción Animal. Tomo XII. Producciones cinegéticas, apícolas y otras. Coordinador y Director C. Buxadé Carbó. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España 293-310.
3. Ammor, M; Flórez, A; Mayo, B 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food microbiology 24: 559-570
4. Anas, M; Jamal, H; Mebrouk, K. 2008. Antimicrobial Activity of Lactobacillus Species Isolated from Algeriam Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*. World Journal of Dairy & Food Sciences 3(2):39-49.
5. Antiasarán, I; Lasheras, B; Ariño, A; Alimentos y Nutrición en la Práctica Sanitaria.2003.Ed, Díaz de Santos. España.505 p.
6. Association of Analytical Chemists, AOAC. 1998. Official Method 971.09. AOAC International.
7. Astaruskene, A. 1990. Que sabemos del pan de abejas. Traducción al español por Caridad García Speck. URSS N°7.
8. Bauer, A., Kirby, W., Sherrys, J., Turk, C. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45:493-496.
9. Bergey, D.H.; Holt, J. 2009. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Systematic Bacteriology.9 ed. USA.
10. Betoret, E; Betoret, N; arilla, A; Bennár, M; Barrera, C; Codoñer, P; Fito, P. 2012. No invasive methodology to produce a probiotic low humid Apple snack with potential effect against *Helicobacter pylori*. Journal of Food Engineering 110: 289-293.
11. Bilash, N. 1990. Influencia de las reservas de pan de abejas en la calidad de la miel. Editorial Agropromizdat (4):6-7.
12. Bourdichon, F; Casaregola, S; Farrokh, C; Frisvad, J; Gerds, M; Hammes, W; Harnett, J; Huys, G; Laulund, S; Ouwehand, A; Powell, I; Prjapati, J; Seto, Y; Schure, E; Boven, A;

Vankerckhoven, V; Zgoda, A; Tuijelaars, S; Hansen, E. 2012. Food Fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97

13. Bradbear, N. 2005. La apicultura y los medios de vida sostenibles. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia.

14. Bravo, L; Correa, Y; Clausell, J; Fernández, A; Ramírez, M; Núñez, F; Ledo, Y; Cruz, Y. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Revista Chilena de Infectología* 26(3):233-238.

15. Caceres, P; Gotteland, M. 2010. Probiotics in Chile: Which are the strains and what are their effects on human health? *Revista chilena de Nutrición* 37(1): 97-109.

16. Calero, M; Flores, J; Campano, F. 2005. ¿Por qué son tan útiles nuestras abejas en la polinización? El colmenar. *Revista Internacional de Apicultura* 77:24-29.

17. Cariello, M., Castañeda, L., Riobo, I. 2007. Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 7(3):26-37.

18. Castro, L; Rovetto, C. 2006. Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica* 37(4): 308-314.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing; sixteenth informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute 26(3):1-35.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing; seventeenth informational supplement M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute 7 (1):1-177.

21. Contreras, M; Izquierdo, P; Allara, M, García, A; Torres, G; Céspedes, E. 2007. Determinación de aminas biógenas en quesos madurados. *Revista científica FCV-LUZ*. 2007 XVII (1): 89-95.

22. Corry, J; Curtis, G; Baird, R. 1999. Culture Media for Food Microbiology. Progress in Industrial Microbiology. Elsevier Science. Amsterdam.

23. Costa, A; Grael, E; Moreno, I; Gajardani, L; Martelo, F; Marques, D; Santos, A. 2007. Selective enumeration and viability of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* in a new fermented milk product. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:173-177

24. Del Risco, C; Pérez, A; Pazos, V; Rodríguez, G; Leiva, V; Puig, Y; García, R. 2012. Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 43(1):17-21.

-
25. Del Risco, C. 2004. Polen-Pan de abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud humana y Microbiología, Cuba.
 26. Doherty, S; Auty, M; Stanton, C; Ross, R; Fitzgerald, G; Brodkorb, A. 2012. Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. International Dairy Journal 22:31-43
 27. Dunne C, O'Mahony L; Murphy E; Thornton G, Morrissey D,O'Halloran S.2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. American Journal Clinical Nutrition 73: 386S-392S.
 28. Edwards, C; Hagg, M; Collins, R; Hutson, R; Huang, Y. 1998.*Lactobacillus kunkeei* sp. Nov: spoilage organism associated with grape juice fermentations. Journal of Applied Microbiology 84: 698-702.
 29. Ekelund, K ;Lemcke, A. 2004. Evaluation of Gastrointestinal Symptoms as primary signs of severe invasive group a streptococcal infections. Indian Journal of Medical Research 119: 179-182.
 30. Ewaschuck, J; Dieleman, L. 2006.Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. World Journal Gastroenterology 12(37)5941-5950.
 31. Ferreira, C; Salminen, S; Grzeskowiak, L; Brizuela, M; Sánchez, L; Carneiro, H; Bonnet, M. 2011. Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health. Revista de Salud Animal 33(3): 137-146.
 32. Ferreira, C; Favaro, C. 2004.Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. Brazilian Journal of Microbiology 35: 151-156
 33. Flores J. 2002. Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos. Alimentación, nutrición y agricultura. FAO 31:42-51.
 34. Fooks, L; Gibson, G. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition 88 S39-S49.
 35. Fuenmayor, C. 2009. Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
 36. Fuenmayor, C; Quicazán. M; Figueroa, J. 2009. Fermentación en fase sólida de polen de abejas con bacterias probióticas para la obtención de un alimento funcional.
 37. Fuster, G; González, I. 2007. Probióticos y prebióticos e la práctica clínica. Nutrición hospitalaria 22:26-34.

38. García, D; Rojas, M; Sánchez, J. 2006. Contenido Microbiológico Cultivable del Tracto Intestinal y Polen Almacenado de *Apis mellifera* (Himenoptera: Apidae). Acta Biológica Colombiana 11(1):123-129.
39. García, M. 1998. Recolección de polen durante un día por *Apis mellifera* L. (Himenoptera, Apidae), II. Lagascalía 20(2):195-209.
40. García, Y; Boucourt, R, Albelo, N; Herrera, F; Núñez, O; Dieppa, O; Torres, V; Noda, A. 2008. Caracterización química y microbiológica de las excretas de pollos de ceba para su utilización en la obtención de probióticos. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 42(3): 285-289.
41. Gibson, G; Roberfroid, M. 1999. Colonic Microbiota Nutrition and Health. Dordrecht: Kluwer academic publishers. The Netherlands, p.304
42. Gibson, G., Fuller, R. 2000. Aspects of *In vitro* and *In vivo* Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human use. Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health. Journal of Nutrition 130:391S-395S.
43. Gilliam, M. 1979. Microbiology of Pollen and Bee Bread, the Yeasts. Apidologie 10(1): 43-53.
44. Gilliam, M. 1980. Biochemistry and Microbiology of Pollen Collected by Honey Bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *prunus dulcis*. II protein, amino acids and enzymes. Apidologie.11(2): 163-171.
45. Gilliam, M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. FEMS Microbiology letters 155: 1-10
46. Giraffa, G; Chanishvili, N; Widyastuti, Y. 2010. Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. Research in microbiology 161(6):480-487
47. Gómez, R. 1998. Evolution of Bacterial Resistance to Antibiotics during, the last three decades. International Microbiology 1:279-284.
48. Gómez, A. 2011. Hambre de proteínas en otoño ¿Cómo solucionarlo?. Apicultura sin fronteras 57: 7-9.
49. González, B; Treviño M; Jiménez Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. Revista de Salud pública y Nutrición 4: 99-106.
50. González, B; Jiménez, Z; Heredia, N; Villarreal, L; García, G; Gómez, M. 2006. Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var *Typhimurium*. 2006. Revista de divulgación científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León IX (4):365-374.

-
51. Gorbach S. 2002. Probiotics in the third millennium. Dig Liver Dis.Tufts University School of Medicine.USA.p 2-7.
52. Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. 2001. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. Infection and Immunity 69(3):1547-1553.
53. Guarner, F; Khan, A; Garish, J; Eliakim, R. 2008. Probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organisation Practice Guideline.p22.
54. Gupta, V; Garg, R. 2009. Probiotics. Indian Journal Microbiology27:202-209.
55. Holzapfel, W; Haberer, P; Geisen, R; Björkroth, J; Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition 73(2):365S-373S.
56. Hrasnigg, N; Brodschneider, R; Fleishmann, P; Crailsheim, K. Las abejas obreras (*Apis mellifera* L.) son capaces de aprovechar el almidón como combustible para el vuelo y los zánganos no. Comisión permanente de Biología Apícola. Institut für zoologie an der Karl-Franzens-Universität in Graz. Austria. 3p.
57. Instituto nacional de salud- Subdirección de vigilancia y control.2007. Evento de vigilancia: Mortalidad por EDA. Primer semestre de 2007.p.5 de 22.
58. Isolauri, E; Sütas Y; Kankaanpää P; Arvilommi H; Salminen S. 2000. Probiotics: effects on immunity. American Journal of Clinical Nutrition 73(2): 444S-450S.
59. Jensen, H; Grimmer, S; Naterstad, K; Axelsson, L. 2012. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. International of Food Microbiology 153: 216-222.
60. Jurado, H; Aguirre, D; Ramírez, C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. Revista MVZ Córdoba 14(2):1723-1735.
61. Kandler, O; Weiss, N. 1986. Regular, Nonsporing, Gram-Positive Rods. Sneath P.H.A, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore 2:1209-1234.
62. Kaur, I; Chopra, K; Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. European Journal of Pharmaceutical Sciences15(1): 1-9
63. Klayraung, S; Okonogi, S; Viernstein,H. 2008. Comparative Probiotic Properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from Thai Traditional Fermented Foods: Miang and Nham. Research Journal of Biological Sciences 3(9): 1119-1124.

-
64. Klayraung, S; Okonogi, S. 2009. Antibacterial and Antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang. Brazilian Journal of Microbiology 40(4): 757-766.
65. Kos, B; Suskovic, J; Goreta, J; Matosic, S. 2000. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. Food technology biotechnology 38(2): 121-127.
66. Kulp, K; Lorenz, K. 2003. Handbook of dough Fermentations. Library of congress.USA.p. 297.
67. Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics, pp. 115-175. Wiley, New York.
68. Lee, Y; Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics.2 ed. Wiley. Canada.
69. Lee, Y. 2009. Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In: Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons, USA. P 178-185.
70. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and cell cultures. 2011. Bacterial Nomenclature Up-to-Date database. DSMZ.
71. León, A; Montoya, O; Motato, K; Granda, D; Caro, C; Restrepo, J; Echeverry, S; Valencia, J; Quinchia, L. 2006. Bacteria ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. Vitae, Revista de la facultad de Química Farmacéutica 13(2): 26-35.
72. Leveau, J; Bouix, M.2000. Microbiología industrial (Microorganismos de interés industrial). Ed Acribia. Zaragoza, España.
73. Lortal, S; Rousseau, M; Boyaval, P; Heijenoort, J. 1991. Cell wall and autolytic system of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046. Journal of General Microbiology 137: 549-559.
74. Madigan, M; Martinko, JM; Parker, J. 2004. Brock, Biología de los Microorganismos.10 ed. Prentice hall. P.1089.
75. Maldonado, N; Ruiz, C; Otero, M; Sesma, F; Nader, M. 2012. Lactic acid bacteria isolated from Young calves-Characterization and potential as probiotics. Research in Veterinary Science 92: 342-349.
76. Marteau P, Vrese M, Cellier C. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American Journal of Clinical Nutrition 73: 430-436.
77. Maurad, K; Meriem, K. 2008. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. Grasas y aceites 59(3):218-224.

-
78. Mejía, J; Chacón, Z; Guerrero, B; Rojas, J; López, G. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*: Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. Revista científica 17(2):178-185.
79. Mennickent, S; Green, K. 2009. Los probióticos y su utilidad terapéutica. Revista Ciencia Ahora 24:p31-38.
80. Michail, Sonia. 2009. The Role of probiotics in allergic diseases. Allergy, Asthma & Clinical Immunology 5:5 p1-7.
81. Mikelsaar, M. 2011. Human microbial logy: Lactobacilli, probiotics, selective decontaminant. Anaerobe 17:463-467
82. Mikelsaar, M; Zilmer, M. 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic. Microbial Ecology in Health and Disease 21:1-27.
83. Miles, A; Misra.S. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene 38: 732-49
84. Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. 2010. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas. Giro editores Ltda. 221.
85. Ministerio de Agricultura y de desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.2006. La Cadena de las Abejas y la Apicultura en Colombia. Bogotá, Colombia.
86. Mokhbi, A; Kaid-Harche, M; Lamri, K. 2009. Selection of *Lactobacillus plantarum* strains for their use as starter cultures in Algerian olive fermentations. Grasas y Aceites. Departement des Sciences Agronomiques 60(1): 82-88.
87. Monteagudo, A; Rodríguez, L; Rúa, J; Martínez, H; Navasa, N; García, M; Ferrero, M. 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. Journal of Functional Foods 4: 531-541
88. Morelli, L. 2000. *In vitro* Selection of probiotic Lactobacilli a Critical Appraisal. Current Issues in Intestinal Microbiology 1(2):59-67.
89. Morelli, L. 2004. Taxonomía y fisiología de las bacterias acidolácticas. Efectos y funciones en nutrición. Instituto de Microbiología UCSC.
90. Munitaegui, S.; Sancho, T.; Terradillos, L.; Huidobro, J.; Simal-Lozano, J. 1993. Composición del polen apícola. En: Vida Apícola 59: 44-48.
91. Münstedt, K; Bogdanov, S. 2009. Bee products and their potential use in modern medicine. Journal of Apiprodukt and ApiMedical Science 1(3):57-63.
92. Murray, P; Rosenthal, K; Pfaller, M. 2006. Microbiología Médica 5 ed, Elsevier. España.

-
93. Mutsaers, M; Blitterswijk, H; Leven, L. 2005. Bee Products. Agrodok 42. Agromisa Foundation. Wageningen, Holanda.
94. NCCLS (National Committee for clinical Laboratory Standards). 1999. NCCLS Document M-100-S9. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th. Information supplement.
95. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 2004. Organización Mundial de la Salud. Foro mundial FAO/OMS de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos. Octubre. Tailandia.
96. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 2001. Organización Mundial de la Salud. Estudio alimentación y Nutrición. Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Octubre. Argentina.
97. Ouwehand A; Vesterlund, S. 2003. Health aspects of probiotics. The Investigational drugs Journal 6(6):573-580.
98. Oyetayo, V. 2004. Phenotypic Characterization and Assessment of the inhibitory potential of *Lactobacillus* isolates from different sources. African Journal of Biotechnology 3(7): 355-357
99. Pesante, D. 2008. Recomendaciones de manejo de la abeja melífera, *Apis mellifera* (L.) como polinizador en granos, hortalizas y legumbres en Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico. 25p.
100. Pérez, A. 1983. Pollen and its harvesting. Reprint de la international Bee Research Association. Ed Bee World 56 (4): 155-158
101. Piatek, J; Gibas, M; Olejnick, A; Krauss, H; Wierzbicki, K; Zukiewicz, W; Glowacki, M. 2012. The ability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination *in vitro* study. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 19(1):99-102.
102. Picozzi, C. 2010. Manejo e identificación de *Lactobacillus* y Levaduras por métodos tradicionales y moleculares: Seminario Internacional *Lactobacillus* y Levaduras Funcionales en Alimentos. 2010. Bogotá. Colombia.
103. Picozzi, C. Gallina, S; Della, T; Foschino, R. 2005. Comparison of cultural media for the enumeration of sourdough lactic acid bacteria. Annals of Microbiology 55(4):317-320.
104. Pryce, JD. 1969. A modification of the barker-Summerson method for the determination of acid lactic Analist 94: 1151-1152.
105. Quigley, E. 2010. Prebiotics probiotics; modifying and mining the microflora. Pharmacological research: the official of the Italian pharmacological society 61(3):213-218.

-
106. Rauch, M; Lynch, S. 2012. The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. *Current Opinion in Biotechnology* 23: 192-201.
107. Reid, G; Jass J; Sebulsky M; McCormick J. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 16(4): 658-672.
108. Rodrigues, D; Rocha, T, Gomez, A; Goodfellow, B; Freitas, A. 2012. Lipolysis in probiotic and symbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry* 131: 1414-1421
109. Rodríguez, M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
110. Rodríguez, J. 2006. Microorganismos y Salud. Bacterias lácticas y Bifidobacterias probióticas. Ed Complutense. Madrid, España.
111. Rojas, C; Vargas, P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. 2008. *Tecnología en marcha* 21(2): 9-16
112. Rolfe RD. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. Symposium: Probiotic Bacteria: Implications for Human Health. *Journal Nutritional* p.396-402.
113. Sáenz de Rivas, C. 1976. Sobre la nomenclatura palinológica la esporodermis. *Anal.Inst.Bot Cavanilles* 33:159-177.
114. Sahadeva, R; Leong, S; Chua, H; Tan, C; Chan, H; Tong, E; Womg, S.2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International food research journal* 18(4): 1515-1522.
115. Sánchez, Cristian. 2003. Crianza y producción de Abejas, Apicultura, Edición Ripalme, Perú.
116. Santos, R; Raffatellu, M; Bevins, C; Adams, G; Tükel, C. 2009. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. Elsevier Ltd. *Trends in Microbiology* 17: 498-506.
117. Schillinger, U; Lücke, F. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906
118. Schrezenmeir J; De Vress M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotic approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2): 361- 364.
119. Scott, J. 2001. A Review of probiotics: Are they really "Functional Foods"? Proceedings of the Annual Convention of the AAEP 47: 27-31.
120. Sedano, J. 2006. Selección de cepas nativas de *Lactobacillus* con actividad inhibitoria y tolerantes al etanol aisladas de "masato". Tesis (Biología).Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de san Marcos. Peru.

-
121. Seema, P; Kumaran, P. 2005. Biochemical characterization of Lactic acid Bacteria isolated from fish and prawn. *Journal of culture collections* 4: 48-52
122. Serna, L; Rodríguez, A. 2006. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 9(1): 40-45.
123. Serna, L; Valencia, L; Campos, R. 2010. Cinética de fermentación y acción microbiana de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Revista Facultad Ingeniería Universidad de Antioquía* (5): 55-65.
124. Sheil, B; Shanagan, F; O'Mahony, L. 2007. Probiotic Effects on Inflammatory Bowel disease. *The Journal of Nutrition* 137(3):819S-824S
125. Shida, K; Nanno, M. 2008. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends in Immunology* 29(11): 565-573.
126. Shiva, C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad autónoma de Barcelona. España.
127. Silvi, S; Verdenelli, M; Orpianesi, C; Cresci, A. 2003. EU Project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. *Journal of food engineering* 56:195-200
128. Soto, L; Frizzo, L; Bertozzi, E; Avataneo, E; Sequeira, G; Rosmini, M. 2010. Molecular Microbial Analysis of *Lactobacillus* Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use. *Veterinary Medicine International* 2010.7p.
129. Spanopoulos, M; Ponce, J; Barba, G; Ruelas, J; Tiznado, M; Hernández, C; Shirai, K. 2010. Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de Tilapia (*Oreochromis sp*), para la alimentación de especies acuícolas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 9(23):167-178.
130. Stomatova, I. 2010. Probiotic activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* in the oral cavity. Helsinki University print 2010.260p.
131. Tajabadi, N; Mardan, M; Abdul, M; 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*. Springer, INRA 42: 642-649.
132. Tannock, G. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biology* 1(1):53-64.

-
133. Vinderola, C; Reinheimer, J. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36(9,10): 895-904.
134. Vit, P; Herrera, P; Rodríguez, D; Carmona, J. 2008. Caracterización de polen apícola fresco recolectado en Cacute, en los Andes Venezolanos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 39(2):7-11
135. Vitoria, J. 2004. Alimentos funcionales. Prebióticos, probióticos y otros. Aplicación actual en Pediatría. Universidad del país vasco. XXI Jornada de Pediatría de Gipuzkoa. Donostia. Octubre 2004.
136. Wood, B.J.B; Holzapfel, W.H. 1995. The genera OF Lactic Acid Bacteria. Blackie academic and professional. Chapman & Hall. India.p.392.
137. Yavuzdurmaz, H. 2007. Isolation, characterization determination of probiotic properties of Lactic Acid Bacteria from human milk. Tesis de maestría. Engineering and sciences of Izmir Institute of Technology.Turkey.
138. Young, R; Huffmans S. 2003. Probiotic use in children. *Journal Pediatric Health Care*17: 277-283.
139. Zamora, L. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangra de matadero. Tesis doctoral. Universitat de Girona. España.
140. Zhou, J; Pillidge, C; Gopal, P; Gill, H. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 98: 211-217.