



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD
DE BIOTECNOLOGÍA**

**Aislamiento, identificación y actividad
antimicrobiana de bacterias ácido lácticas en
miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona
mexicana*)**

TESIS

Para obtener el título de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

LCN. CLAUDIA VALENCIA OLIVARES

Director:

Dr. Gabriel Abraham Cardoso Ugarte

Co-directora:

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

Asesor:

Dr. Elie Girgis El Kassis

Asesora:

Dra. María de Lourdes Meza Jiménez

Asesor externo:

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez



Puebla, México, Enero de 2022



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

SE APRUEBA LA TESIS:

Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas en miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*)

Del alumno: Claudia Valencia Olivares

Comité Asesor

Dr. Gabriel Abraham Cardoso Ugarte

Director de Tesis

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz
Co-Directora

Dr. Elie Girgis El Kassis
Asesor

Dra. María de Lourdes Meza Jiménez
Asesora

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez
Asesor externo

Puebla, México.

Enero de 2022

SafeAssign Originality Report

Proyectos Tesis • Tesis de Maestría-Valencia Olivares Claudia

[Ver el diseño anterior del Originality Report](#)

CLAUDIA VALENCIA OLIVARES

Puntuación total:  **Riesgo bajo** 7 %

UUID de entrega: 5680d65-1467-4341-01625e01079182

Número total de informes

1

Coincidencia máxima

7 %

Tesis+CVO-análisis+plágio_compressed.pdf

Coincidencia promedio

7 %

Enviado el


13/01/22

16:35 GMT-6

Conteo de palabras promedio

20.635

Más alto: Tesis+CVO-análisis+plágio_com...

 **Contenido adicional** 7 %

Conteo de palabras: 20.635
Tesis+CVO-análisis+plágio_compressed.pdf

Internet (16)

4 %





 *nutricionhospitalaria*
 *scielo*
 *scielo*
 *slid*
 *scielo*
 *scribd*




 *javeriana*
 *demilesgabajas*
 *scielo*
 *monografias*
 *saludybelleza*





 *scielo*
 *scielo*
 *rincondelvago*
 *ilmcontent*
 *revistabionatura*

Base de datos global (12)

2 %

 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*

 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*

 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*
 *Documento del estudiante*

Archivo de documentos institucionales (3)

1 %

 *Documento del estudiante*

 *Documento del estudiante*

 *Documento del estudiante*

Fuentes principales (3)

 *nutricionhospitalaria*

 *Documento del estudiante*

 *javeriana*

AGRADECIMIENTOS

Finalmente ha llegado el día de concluir esta etapa en mi carrera académica y esto no hubiera sido posible sin el apoyo de mi tutor, mis asesores, amigos y compañeros de la maestría en biotecnología de la UPAEP. En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor, el Doctor Gabriel Abraham Cardoso Ugarte, quien siempre se mostró interesado por mi investigación y siempre estuvo apoyándome cuando en un inicio era difícil el aislamiento de las bacterias en la miel. También le agradezco por brindarme los recursos económicos y las herramientas necesarias para el desarrollo de la investigación con el objetivo de alcanzar los resultados deseados, le agradezco por resolver cada una de mis dudas y de apoyarme para hacer mi doble titulación en la Universidad de Jaén España.

Además, le agradezco a la Doctora Beatriz Pérez Armendáriz, por brindarme su apoyo y conocimientos para el desarrollo de las pruebas antimicrobianas y por ayudarme a realizar mi doble titulación en España. Al igual que al Doctor Elie Girgis El Kassis, a quien le agradezco todo su apoyo para poder realizar la parte molecular de mi investigación y por siempre brindarme sus consejos en cada uno de los coloquios para mejorar mi investigación.

En segundo lugar, quiero agradecer al CONACYT por el apoyo financiero y a la UPAEP por la beca otorgada, con los cuales pude realizar mis estudios de maestría en esta universidad. Y en tercer lugar quiero agradecer a mis amigas de la maestría, Berenice Negrete, Jaqueline Xochicueponi Molina y Andrea Dossetti por todo su apoyo y recomendaciones en el laboratorio, y en especial quiero agradecer a mi amigo Jesús Alcaide, a quien conocí durante la maestría y siempre estuvo apoyándome y dándome ánimos durante este proceso, al igual que a mis compañeros Javier Burgos, Gabriel Robles y María José Alvarado por su apoyo en el laboratorio.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a mis papás y a mi familia, que siempre estuvieron brindándome su apoyo en todo momento durante mi maestría tanto en México como en España, y que siempre han sido pieza clave para que yo pueda continuar preparándome académicamente y profesionalmente. Especialmente, le agradezco a mi mamá, por sus palabras de aliento cuando las cosas fueron complicadas, por sus consejos y por siempre escucharme.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
Capítulo I.....	11
1.1 Introducción	11
1.2 Planteamiento del problema	12
1.3 Pregunta de investigación.....	12
1.4 Justificación.....	12
1.5 Objetivo general.....	12
1.6 Objetivos específicos	13
1.7 Hipótesis.....	13
Capítulo II	14
MARCO TEÓRICO	14
2.1 Abejas sin aguijón.....	14
2.1.1 Especies en el mundo	15
2.1.2 Especies en México.....	15
2.1.2.1 La especie <i>Scaptotrigona mexicana</i>	16
2.1.3 Productos elaborados por las abejas.....	17
2.2 Miel producida por las abejas.....	18
2.2.1 Diferencias en composición de la miel de abeja europea y de la miel de abeja sin aguijón	19
2.2.2 Propiedades terapéuticas de la miel de abeja sin aguijón	20
2.2.3 Propiedades antioxidantes de la miel de abeja sin aguijón	22
2.2.4 Propiedades antimicrobianas de la miel de abeja sin aguijón	23
2.3 Bacterias ácido lácticas.....	23
2.3.1 Aplicaciones en la industria de alimentos.....	24
2.3.2 Otras aplicaciones de las bacterias ácido lácticas	26
2.4 Probióticos	27
2.4.1 Importancia en la salud	29
2.4.1.1 Probióticos en la obesidad y en el tratamiento de dislipidemias	30
2.4.1.2 Probióticos en la Diabetes Mellitus tipo 2.....	31
2.4.1.3 Probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal	32
2.4.1.4 Probióticos en el tratamiento de alergias.....	33
2.5 Alimentos fermentados.....	34
2.5.1 Productos lácteos fermentados.....	35
2.5.2 Bebidas lácteas fermentadas	36
Capítulo III.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1 Materiales	38

3.1.1 Material biológico	38
3.2 Métodos	38
3.2.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) de la miel	39
3.2.2 Identificación de BAL	41
3.2.2.1 Tinción de gram.....	41
3.2.2.2 Prueba de catalasa	42
3.2.3 Actividad antimicrobiana	42
3.2.3.1 Método de difusión en disco.	42
3.2.3.2 Actividad antimicrobiana del sobrenadante (microplacas de 96 pocillos).....	43
3.2.4 Método molecular de PCR (amplificación del gen 16S)	45
3.2.4.1 Extracción de ADN	46
3.2.4.2 Electroforesis para comprobar extracción de ADN	46
3.2.4.3 Pasos para la PCR, Gen 16S 27F 1492R.....	47
3.2.4.4 Electroforesis para comprobar amplificación del gen 16S.....	48
3.2.4.5 Purificación del producto de PCR	48
3.2.4.6 Fluorimetría de ADN.....	49
3.2.5 Prueba fermentación de azúcares.....	49
3.2.6 Análisis estadístico.....	50
Capítulo IV	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) de la miel.....	51
4.2 Actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos frente a bacterias patógenas mediante el ensayo de difusión de discos.	55
4.3 Actividad antimicrobiana del sobrenadante usando microplacas.....	59
4.4 Identificación de BAL mediante PCR.....	62
4.5 Prueba fermentación de azúcares.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Géneros de bacterias usadas como probióticos	28
Figura 2. Usos terapéuticos de los probióticos	29
Figura 3. Pasos generales para la preparación de alimentos lácteos fermentados	36
Figura 4. Metodología para la identificación de BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón (<i>Scaptotrigona mexicana</i>).	39
Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón (<i>Scaptotrigona mexicana</i>) y los diferentes medios utilizados.	40
Figura 6. Procedimiento para el método de difusión en disco.	43
Figura 7. Diseño de las microplacas (96 pocillos) para evaluar la actividad antimicrobiana del sobrenadante.	44
Figura 8. Esquema que muestra la forma en que se cargaron los pozos en el gel de electroforesis (a) e imagen del gel con las muestras de BAL y ladder en los pozos (b).	47
Figura 9. BAL aisladas en el tratamiento 1 (Agar MRS). Al microscopio se observan bacterias gram positivas y gram negativas.....	51
Figura 10. BAL aisladas en tratamiento 1 (Agar MRS) mediante estría cruzada, bacterias gram positivas y catalasa negativa.	52
Figura 11. BAL aisladas en tratamiento 2 (Agar MRS+ Glucosa 1%). Observándose bacterias gram positivas y gram negativas.....	53
Figura 12. BAL aisladas en el tratamiento 3 (Agar MRS + Glucosa 1% + Manitol 1.2 %), gram positivas y catalasa negativa.	54
Figura 13. BAL aisladas en el tratamiento 4 (Agar MRS+ Glucosa 1% + Manitol 1.2%+ HCl pH 4). En su mayoría gram positivos.....	54
Figura 14. BAL aisladas en el tratamiento 5 (Agar M17). Gram positivas y catalasa negativa.	55
Figura 15. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a <i>Salmonella Typhimurium</i>	58
Figura 16. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 18. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a <i>Shigella flexneri</i>	58
Figura 17. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figura 19. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	58
Figura 20. Efecto de los diferentes tratamientos (D1) frente a las bacterias gram positivas.	60
Figura 21. Efecto de los diferentes tratamientos (D1) frente a las bacterias gram negativas.....	61
Figura 23. Amplificación del gen 16 S de las cuatro BAL, al verse una banda marcada a 1500pb.	63
Figura 22. ADN de las cuatro BAL, al verse todas las bandas marcadas.	63
Figura 24. Secuencias corregidas obtenidas de cada una de las BAL aisladas en los diferentes tratamientos.	64
Figura 25. Especies de BAL con mayor homología con respecto a la secuencia de interés aislada en el tratamiento con M17.	65
Figura 26. Fermentación del glicerol (negativo).	67
Figura 27. Fermentación de D-xilosa (negativo).....	67
Figura 28. Fermentación de inulina (positivo).	67
Figura 29. Fermentación de glucosa (positivo).	67
Figura 30. Fermentación de D-manitol (positivo).	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Diferencias en la composición de la miel de abeja europea y la miel de abeja sin aguijón.....	20
Tabla II. Bacterias ácido lácticas utilizadas como cultivos iniciadores en varios tipos de alimentos fermentados.....	25
Tabla III. Aislamiento y crecimiento de las bacterias ácido lácticas en los diferentes tratamientos.....	52
Tabla IV. Actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos frente a bacterias patógenas mediante el ensayo de difusión de discos.....	56
Tabla V. Efecto del sobrenadante de las BAL frente a bacterias gram negativas y gram positivas.	59
Tabla VI. Concentración de ADN presente en cada una de las muestras.	63
Tabla VII. Análisis del alineamiento de secuencias obtenidas mediante la amplificación del gen 16S.....	64
Tabla VIII. Prueba de fermentación de azúcares de la BAL aislada en los diferentes tratamientos.	66

RESUMEN

Los probióticos contienen principalmente bacterias ácido lácticas (BAL), y en los últimos años ha aumentado su investigación debido a que pueden ayudar en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas. Las BAL se encuentran principalmente en diversidad de alimentos y bebidas fermentadas, incluyendo su presencia en miel. Por esta razón, en este estudio se realizó el aislamiento e identificación de BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, de la región de Cuetzalan, Puebla a partir del método molecular de PCR mediante la amplificación del gen 16S y se evaluó su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de interés alimentario (*E. coli*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *S. aureus* y *E. faecalis*) a través del ensayo de difusión en disco y del efecto del sobrenadante de las BAL aisladas en diferentes tratamientos. La presencia de *Lactiplantibacillus plantarum* cepa DSM 20174 fue identificada en la miel, al comprobarse mediante la prueba de fermentación de azúcares ya que esta fue negativa a la fermentación de glicerol, D-xilosa y fue capaz de fermentar la inulina. En relación a las pruebas antimicrobianas, se observó que el sobrenadante de la BAL aislada en el tratamiento con MRS+ glucosa 1% y manitol al 1.2% fue capaz de inhibir por completo el crecimiento de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. flexneri* y en un 90.92% el crecimiento de *S. typhimurium*. Mientras que en el ensayo de difusión en disco se encontró que las bacterias gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis*) fueron capaces de ser inhibidas por la BAL presente en todos los tratamientos al igual que las bacterias gram negativas (*S. typhimurium* y *S. flexneri*), a excepción de *E. coli* que no fue capaz de ser inhibida por la BAL presente en el tratamiento con agar M17. Los resultados obtenidos pueden ser indicativo de que la BAL presente en este tipo de miel posee potencial para poder usarse en la formulación de alimentos probióticos fermentados.

Palabras Clave: Bacterias ácido lácticas (BAL), miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*), probióticos, actividad antimicrobiana, *Lactiplantibacillus plantarum*.

ABSTRACT

Probiotics mainly contain lactic acid bacteria (LAB), and in recent years their research has increased because they can help in the prevention of chronic degenerative diseases. LABs are mainly found in fermented foods and beverages, including their presence in honey. For this reason, in this study, the identification of LAB present in stingless honey, *Scaptotrigona mexicana*, from Cuetzalan, Puebla, was carried out using the molecular method of PCR by amplifying the 16S gene. The antimicrobial activity was evaluated against pathogenic bacteria (*E. coli*, *S. typhimurium* and *S. flexneri*, *S. aureus* and *E. faecalis*) through the disk diffusion test and the effect of the LAB supernatant isolated in different treatments. The presence of *Lactiplantibacillus plantarum* strain DSM 20174 was detected in the honey because it was negative to the fermentation of glycerol, D-xylose, and was capable of fermenting the inulin according to the sugar fermentation test. Concerning the antimicrobial tests, it was observed that the BAL supernatant isolated in the treatment with MRS + 1% glucose and 1.2% mannitol was able to inhibit the growth of *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. flexneri* completely and inhibit the growth of *S. typhimurium* to the extent of 90.92%. While in the disk diffusion test, it was found that gram-positive bacteria (*S. aureus*, *E. faecalis*) were capable of being inhibited by the BAL present in all treatments, and also gram-negative bacteria (*S. typhimurium* and *S. flexneri*) except *E. coli* which was not able to be inhibited by the BAL present in the M17 agar treatment. The results may indicate that the BAL present in this type of honey possesses the potential to be included in the formulation of fermented probiotic foods.

Key words: Lactic acid bacteria (LAB), stingless honey (*Scaptotrigona mexicana*), probiotics, antimicrobial activity, *Lactiplantibacillus plantarum*.

Capítulo I

1.1 Introducción

En el mundo ha incrementado significativamente el número de personas con enfermedades crónicas degenerativas no transmisibles, como lo son la diabetes y la obesidad, ya que de acuerdo con la (OMS, 2021) a nivel mundial la obesidad se ha triplicado desde el año de 1975, mientras que en el año 2019 murieron aproximadamente 1.5 millones de personas a nivel mundial a causa de la diabetes. Por esta razón ha sido necesaria la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden en la prevención y sirvan como coadyuvantes en el tratamiento de estas enfermedades (Fernández, Hudson, Korpela & Reyes, 2015).

Una de estas alternativas son los probióticos, los cuales se definen como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada” (FAO & OMS, 2006). Las BAL más utilizadas como probióticos pertenecen a especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y estas se han logrado identificar en diferentes alimentos fermentados, como el yogurt, carnes, pescados, vegetales y cereales fermentados (Iqbal et al., 2014; Bintisis, 2018). Por ejemplo, en el estudio realizado por Ataie-Jafari, Larijani, Alavi Majd, & Tahbaz (2009) las BAL (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis*) presentes en el yogurt ayudaron a disminuir los niveles de colesterol total y LDL en pacientes con hipercolesterolemia.

Además, diferentes especies de BAL aisladas de diversas fuentes han presentado actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas como gram positivas, incluso frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) debido a que las BAL presentan ciertos mecanismos como la producción de metabolitos (bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácido orgánicos), así como la competencia por nutrientes, la inhibición de la adhesión de patógenos a las superficies o a través de la activación del sistema inmunológico (Voravuthikunchai et al., 2006; Petrova et al., 2009).

Recientemente se han logrado identificar BAL en la miel principalmente de la región de Malasia y Europa, las cuales también han mostrado actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias gram positivas y gram negativas. Por ejemplo, Lani et al. (2015) identificaron las especies de *Lactobacillus brevis* y a la especie de *Lactobacillus sp.*, en la miel de la abeja melipona de Malasia, las cuales tuvieron actividad antimicrobiana frente a *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*.

El objetivo de esta investigación consiste en el aislamiento e identificación de BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, con la finalidad de evaluar su efecto antimicrobiano frente a patógenos de interés alimentario y ser así una nueva alternativa para ser utilizada en la formulación de un alimento probiótico.

1.2 Planteamiento del problema

Se ha reportado que las propiedades antimicrobianas de la miel producida por las abejas sin aguijón se deben principalmente por su alto contenido en azúcar, su baja actividad de agua y su acidez (Sinacori et al., 2014). Estudios recientes han demostrado que las bacterias ácido lácticas también participan en la inhibición del crecimiento bacteriano ya que estas producen metabolitos como ácidos orgánicos y bacteriocinas (Aween et al., 2012; Ngalimat et al., 2019). Sin embargo, es escasa la información que mencione cuáles son los agentes responsables de este efecto en la especie *Scaptotrigona mexicana*.

1.3 Pregunta de investigación

¿Contiene bacterias ácido lácticas la miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) y estas tienen actividad antimicrobiana?

1.4 Justificación

La identificación de las bacterias ácido lácticas en la miel de abeja *Scaptotrigona mexicana* no se ha realizado en algún estudio anterior y su aislamiento determinará si estas bacterias son viables en una bebida láctea fermentada con la finalidad de conocer su actividad probiótica. Además, esta investigación aportará información que demuestre las propiedades antimicrobianas de la miel producida por este tipo de abeja sin aguijón.

1.5 Objetivo general

Identificar bacterias ácido lácticas en miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) mediante técnicas microbiológicas y moleculares, así como determinar su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas, para su potencial utilización como probiótico en alimentos funcionales.

1.6 Objetivos específicos

1. Aislar bacterias ácido lácticas de la miel de abeja *Scaptotrigona mexicana*.
2. Caracterizar las bacterias ácido lácticas mediante pruebas bioquímicas.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias de interés alimentario *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. flexneri*.
4. Identificar las bacterias ácido lácticas mediante PCR.

1.7 Hipótesis

La miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) contiene bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana.

Capítulo II

MARCO TEÓRICO

2.1 Abejas sin aguijón.

Las abejas sin aguijón pertenecen a la clase *Insecta* y a la familia *Apidae*, pero corresponden a la tribu *Meliponini*. Este tipo de abejas vive en cavidades de forma conjunta, componiéndose siempre de una abeja reina, abejas obreras (hembras) y zánganos (machos) como lo hacen las abejas europeas (Kwapong et al., 2010).

Morfológicamente las abejas sin aguijón están formadas por tres partes principales: la cabeza, el tórax y el abdomen. La cabeza está conformada por antenas, ojos compuestos y simples y mandíbulas, mientras que al tórax se encuentran unidos dos pares de alas y tres pares de patas. Las patas traseras de las abejas obreras presentan una corbícula o canasta para recolectar y transportar el polen (Quezada-Euán, Paxton, Palmer, Itzá, Tay, & Oldroyd, 2007).

En relación con su alimentación este tipo de abeja obtiene de las flores el néctar y polen que necesitan para sobrevivir ya que estos aportan energía y nutrientes como proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales principalmente, además requieren de agua para mantener una temperatura adecuada en la colmena. Aunque hay especies de meliponinos que no se alimentan de las flores y obtienen el polen de otras colonias de abejas (Guzmán, Rincón, & Vandame, 2004; Kwapong et al., 2010).

El néctar representa la principal fuente de energía para la abeja porque aporta carbohidratos y está en su estómago tiene la capacidad de transformarlo en miel. Esta miel es almacenada en las celdas o potes de los nidos para ser utilizada como fuente de alimento en épocas de escasez (Michener, 2007).

Estas abejas suelen construir sus nidos con gomas, resinas y ceras, pero otros tipos de abejas sin aguijón además utilizan arena y barro, los cuales mezclan con el propóleo. Los nidos se encuentran principalmente en tallos y ramas de árboles vivos, en troncos muertos, hormigueros abandonados y en grietas de las paredes de las casas (Mi & Go, 2011).

Para la supervivencia de estas especies de abejas se requieren temperaturas óptimas y cierta humedad; normalmente la mayoría de las abejas sin aguijón prefieren climas cálidos y es por esta razón que en días calurosos se encuentran más activas que en días fríos o nublados. Además, estas abejas se encuentran a determinadas altitudes, que oscilan entre los 1000 m y 2000 m. Por ejemplo, se ha reportado que la especie *Scaptotrigona mexicana* se encuentra principalmente a 1000 metros sobre el nivel del mar mientras que las especies *Melipona fasciata*, *P. bilineata*, y *G. acapulconis* suelen encontrarse a altitudes cercanas a los 2000 m (Ayala, González, & Engel, 2012).

Los meliponinos tienen gran importancia a nivel mundial porque participan en la polinización de plantas para asegurar su reproducción, por su producción de miel, propóleos, cera y pan de abeja a los cuales se les atribuyen propiedades medicinales y que pueden ser utilizados en beneficio de la salud del ser humano (Kwapong et al., 2010; Yurrita et al., 2017).

2.1.1 Especies en el mundo

Existen a nivel mundial aproximadamente 500 especies de abejas sin aguijón, las cuales se encuentran principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, es decir, en países como Australia, Sudamérica, África y Malasia (Vit, Roubik, & Pedro, 2012). El 80% de estas especies habitan una gran diversidad de ecosistemas del hemisferio occidental que abarca desde México hasta Brasil, el norte de Argentina, las islas del Caribe y el Pacífico (Gonzalez & Engel, 2004).

En África se han identificado 26 especies de abejas sin aguijón mientras que en Malasia se ha reportado la presencia de 33 especies, sin embargo solo dos géneros han sido domesticadas a lo largo del mundo, entre estos se encuentran el género *Melipona* y *Trigona* (Mohd, Mohd, Sajap, Rosliza, & Suri, 2010; Vit, Roubik, & Pedro, 2012).

En América las abejas sin aguijón tienen importancia ecológica por ser polinizadores de plantas nativas debido a su anidación perenne y al tamaño de la población (más de 1000 individuos por colonia). Además, las abejas sin aguijón tienen un impacto en la economía y la cultura de la población indígena de esta zona del mundo, debido a que la miel es utilizada en la medicina tradicional y el cerumen se emplea de forma ornamental en rituales religiosos (Slaa et al., 2006; Michener, 2007). En América aproximadamente 60 especies de abejas sin aguijón se encuentran en Suda América y 16 especies en Cetro América y México (Yurrita et al., 2017).

2.1.2 Especies en México

Diversos estudios han señalado la existencia de 46 especies de abejas sin aguijón en México, encontrándose en los estados de Yucatán, Chiapas, Tabasco, Puebla, Colima, Guerrero y Veracruz. De estas 46 especies únicamente 16 son utilizadas para la polinización de cultivos, la producción de miel, polen, cerumen y para el diseño de artesanías (Sánchez-Chino et al., 2019).

El número total de especies reportadas en México representa únicamente el 2.6% del total que existen alrededor del mundo, pero tienen un mayor impacto en el ámbito social, económico y cultural comparado con otros países, incluso aunque en otros lugares del mundo exista mayor diversidad de especies es en México donde se han utilizado desde la época precolombina). La razón de que en México existan menor número de especies comparado con otros países es que se encuentra más

distante del ecuador, sin embargo en nuestro país se localizan diversos géneros de abejas sin aguijón entre los que se encuentran *Plebeia*, *Trigona*, *Melipona Illiger* y *Trigonisca* cada una con doce, nueve, seis y cinco especies respectivamente (Ayala, González, & Engel, 2012).

La mayoría de las especies de abejas sin aguijón se encuentran en la costa del Pacífico, desde Guerrero hasta Chiapas y el sur de Veracruz. Por ejemplo, en el estado de Tabasco se ha reportado la presencia de la especie *Melipona beecheii* y de otras especies de abejas sin aguijón en menor proporción como *Nannotrigona perilampoides*, *Frieseomelitta nigra*, *Trigona fulviventris*, *Scaptotrigona mexicana* y del género *Plebeia sp* (Kumul, Ruiz, Vázquez, & Campos, 2015; Vit, Roubik, & Pedro, 2012).

La especie *Melipona beecheii*, conocida localmente como *xunan cab* o *kolil kab* en Maya, que significa “dama real”, es considerada una de las abejas sin aguijón más importantes cultural y socialmente en México debido a su uso tradicional desde la época de los mayas (Villanueva-G et al., 2005). Mientras que existe otra especie de abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, con importancia económica, ya que es utilizada para polinizar cultivos de aguacate, rambután y café en los estados de Hidalgo, Puebla y Chiapas (May-Itzá, 2008).

2.1.2.1 La especie *Scaptotrigona mexicana*

Scaptotrigona mexicana conocida como abeja del *congo* o *Pisilnekmej* en Náhuatl, es una abeja que presenta las siguientes características morfológicas: color negro, mide entre 5.0 y 5.3 mm de largo, alas de color naranja y presentan una longitud de 5.1 a 5.4 mm (Arnold et al., 2018). Esta especie se caracteriza por construir sus nidos en troncos o ramas de árboles secos en los cuales construyen la entrada de su nido en forma de trompeta. Se encuentra distribuida a lo largo del Golfo de México desde Chiapas hasta Tamaulipas, llegando a vivir hasta en altitudes de 1000 metros sobre el nivel del mar (Ayala et al., 2012).

Este tipo de abeja no se propaga a partir del proceso de enjambrazón, si no que forman colonias nuevas usando material de la colonia antigua, esto es llevado a cabo por las abejas obreras que después de construir la entrada del nido y los cántaros, llega una reina virgen a ocupar el nuevo nido con una parte de la población adulta (Guzmán, Balboa, Vandame, Albores, & Acereto, 2011).

En Cuetzalan, Puebla municipio ubicado en la Sierra Norte del estado, se ha desarrollado la meliponicultura de *Scaptotrigona mexicana* debido a que la miel producida por esta especie tiene un gran valor local e internacional, incluso se ha estimado que se llegan a exportar aproximadamente 2 toneladas de miel al año a Europa principalmente a Alemania (Ayala et al., 2012). Se estima que la

producción de miel por esta especie es alrededor de 600 a 800 mL por colonia y su producción dependerá de la disposición de cultivos y de la fortaleza de las colonias (Guzmán et al., 2011).

Los pobladores de la Sierra Norte de Puebla suelen manejar y cultivar estas abejas en ollas de barro las cuales funcionan como colmenas y son conocidas como “mancuernas”, lo cual facilita que el 15% de las colmenas se puedan multiplicar. Gracias a esto desde hace 10 años, Cuetzalan se ha convertido en uno de los principales productores de miel virgen en el país, superando incluso a Yucatán donde se produce la miel de la especie *Melipona beecheii* (Guzmán et al., 2011).

Las mancuernas están formadas por dos ollas encontradas, la que se encuentra en la parte inferior funciona como cámara de cría donde se encuentran los paneles, mientras que la olla de la parte superior es utilizada por las abejas para almacenar tanto la miel como el polen, que después serán recolectadas por los meliponicultores. Estas mancuernas se abren una vez al año durante la primavera en los meses de abril y junio para cosechar la miel, posteriormente estas mancuernas son selladas nuevamente con ceniza húmeda en la zona de unión de ambas ollas (Salazar, Pérez, Debernardi, Real, Hidalgo, & De la Rosa, 2017).

2.1.3 Productos elaborados por las abejas

Las abejas sin aguijón producen en las colmenas productos que son utilizados por el hombre, entre estos se encuentran la miel, el propóleo, el pan de abeja y la cera o cerumen.

La miel virgen producida por este tipo de abejas no suele usarse para endulzar los alimentos ya que tiene un sabor más ácido comparado con la miel de *Apis Mellifera*, por lo que suele emplearse más como un remedio terapéutico debido a que se le atribuyen propiedades medicinales. Se ha reportado la presencia de inhibinas las cuales inhiben el desarrollo de hongos y bacterias, confiriéndole propiedades antimicrobianas que pueden ayudar en el tratamiento de heridas e infecciones (Dardón & Enríquez, 2008; Vit et al., 2004).

Otro producto elaborado por las abejas es el propóleo, formado por resinas, gomas y exudados de plantas. Dentro de las colmenas el propóleo es utilizado como un agente de protección frente a agentes nocivos por lo que han sido estudiadas sus propiedades terapéuticas, entre las que destaca su actividad antimicrobiana y la estimulación del sistema inmunológico en el cuerpo humano. Por esta razón el propóleo se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades respiratorias, de infecciones en la piel y en la cicatrización de úlceras (Guzmán et al., 2011; Kwapong et al., 2010).

En las colmenas también se puede encontrar otro producto almacenado en los potes de los nidos, conocido como pan de abeja, el cual está formado por polen principalmente, contiene proteínas,

vitaminas y minerales, y suele ser utilizado en los suplementos alimenticios e incluso en alimentos para los niños (Kwapong et al., 2010).

Finalmente, la cera es un producto secretado por las glándulas de las abejas obreras localizadas en su abdomen. A diferencia de las abejas melíferas, los meliponinos mezclan la cera con una resina denominada cerumen la cual puede ser de color blanco, amarillo, café o negro (Arnold et al., 2018). Actualmente la cera es utilizada para la fabricación de cremas corporales y faciales, para bálsamos de labios y también tiene uso en la industria ya que se agrega en productos abrillantadores y para hacer velas, mientras que en la industria farmacéutica se usa para el recubrimiento de tabletas o cápsulas (Kwapong et al., 2010).

2.2 Miel producida por las abejas

La miel es un endulzante natural de consistencia viscosa producido por las abejas, las cuales mezclan el néctar obtenido de las plantas con sus secreciones salivales producidas en su abdomen o con enzimas secretadas por sus glándulas cefálicas. Es almacenada por las abejas en sus colmenas dentro de los potes o en potes mezclados con cera para su maduración (Ávila et al., 2018; Nweze et al., 2017).

Este endulzante natural está compuesto de diversas moléculas en su mayoría fructosa y glucosa (80-85%), agua (15-17%) y ceniza (0.2%), además de otros compuestos en menor proporción, como proteínas, enzimas, minerales, vitaminas, 5-hidroximetilfurfural (HMF), flavonoides y ácidos fenólicos (Das et al., 2015; P. Rao et al., 2016). Los minerales que suelen estar presentes en la miel son el potasio, zinc, fósforo, calcio, sodio, magnesio, sulfuro, cobre, hierro y manganeso (P. V. Rao et al., 2016)

Además de la glucosa y fructosa, algunos estudios han reportado la presencia de otros disacáridos y oligosacáridos en la miel. Por ejemplo, la de Malasia en la especie *Apis dorsata* contiene fructooligosacáridos como la inulobiosa, kestosa y nistosa, la miel de Nueva Zelanda presenta isomaltosa y melecitosa, mientras que la de Italia presenta rafinosa (Zulkhairi Amin et al., 2018).

Sin embargo, su composición y su actividad antimicrobiana puede variar dependiendo de diversos factores como lo son las plantas de las que se alimentan, la localización geográfica, la temporada de cosecha, los tipos de clima, las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Alvarez-Suarez et al., 2010). Incluso de acuerdo con da Costa, Sousa, da Silva, Garruti, & Madruga (2018), el sabor, el aroma y los compuestos fenólicos presentes en la miel están fuertemente relacionados con el polen, néctar, resina, y aceite obtenido de las plantas de las cuales las abejas se alimentan.

De acuerdo con Rao et al. (2016) la mayoría de la miel en el mundo contiene compuestos similares de ácidos fenólicos, incluyendo cafeico, elágico, ferúlico y ácidos p-cumaricos; flavonoides como apigenina, crisina, galangina, hesperetina, kaempferol, pinocembrina y quercetina; y antioxidantes entre los que se encuentran los tocoferoles, ácido ascórbico, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión reducido (GSH).

Los compuestos mencionados anteriormente le brindan propiedades biológicas a la miel que la hacen considerarse como una medicina, estas son: antibacterianas, bacteriostáticas, antiinflamatorias, cicatrización de heridas y quemaduras, su actividad antioxidante y su actividad antimicrobiana (Agbagwa & Otokunefor, 2018). Estas propiedades pueden ser útiles para la prevención de procesos crónicos inflamatorios como lo son la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y la arterioesclerosis (G Vallianou, 2014).

2.2.1 Diferencias en composición de la miel de abeja europea y de la miel de abeja sin aguijón

La miel producida por las abejas sin aguijón a diferencia de *Apis Mellifera* presenta mayor humedad, mayor contenido de cenizas, una alta actividad de agua y mayor acidez libre, pero tiene un menor pH y menor contenido sólido soluble (P. M. Da Silva et al., 2016; Lage et al., 2012). Otra diferencia se encuentra en el contenido de fructosa, ya que se ha reportado que un 48.1% de la miel producida por las abejas sin aguijón presenta menores niveles de azúcares reductores comparado con la miel de *Apis mellifera* (Biluca et al., 2016). Además Abd Jalil, Kasmuri, & Hadi (2017), hacen referencia que la miel producida por las abejas sin aguijón es conocida por su consistencia fluida, su baja cristalización, su color turbio y su sabor ácido. (**Tabla I**).

Abdj Jalil et al. (2017) mencionan que los potes donde almacenan la miel las abejas sin aguijón contienen también cera, compuestos antimicrobianos y propóleo a diferencia de *Apis mellifera* que almacena la miel en potes que contienen únicamente cera. Por esta razón, la interacción de la miel con el propóleo ocasiona que esta se combine con compuestos antimicrobianos derivados de las plantas y esto puede explicar las razones por las que la miel de abejas meliponas presentan mejores propiedades biológicas en comparación con *A. mellifera*.

Tabla I. Diferencias en la composición de la miel de abeja europea y la miel de abeja sin aguijón (Zulkhari et al., 2018).

Propiedades fisicoquímicas	Miel de Tualang, <i>Apis dorsata</i>	Miel de Manuka, <i>Apis melifera</i>	Miel de abeja sin aguijón, <i>Trigona</i> spp.
Apariencia	Marrón oscura	Marrón oscuro	Ambar marrón claro
Contenido de humedad (%)	23.30	18.70	25.00-31.00
pH	3.55-4.00	3.20-4.20	3.15-4.66
Azúcares reductores totales (%)	67.60	75.80	54.90-87.00
Glucosa (%)	29.50	35.90	8.10-31.00
Fructosa (%)	29.60	40.00	31.11-40.20
Sacarosa (%)	0.60	2.80	0.31-1.26
Maltosa (%)	7.85	1.20	ND
Calcio (%)	0.18	1.15	0.017
Potasio (%)	0.51	1.00	0.07
Sodio (%)	0.26	0.0008	0.012
Magnesio (%)	0.11	1.00	0.004
Hidroximetilfurfural HMF (mg/kg)	46.17	400.00	8.80-69.00
Contenido de cenizas (g/100g)	0.19	0.03	0.01-0.12

ND: no detectado.

2.2.2 Propiedades terapéuticas de la miel de abeja sin aguijón

La miel de abeja sin aguijón se ha utilizado por la medicina tradicional para tratar varias enfermedades como los resfriados, la tos y enfermedades respiratorias como la bronquitis mediante la combinación de la miel con limón, mezcal o pulpa de *Crescentia alata*. También la miel de abeja sin aguijón ha sido ampliamente utilizada en la cultura maya para tratar la fiebre, heridas, quemaduras y picaduras de animales ponzoñosos (Reyes-González et al., 2014).

Además de los usos tradicionales, la miel se reconoce en el desarrollo de la medicina moderna debido a su calidad nutricional y a propiedades terapéuticas como las propiedades antiinflamatorias y antibacterianas frente a bacterias y hongos, además de su potencial para tratar la tos y heridas e incluso a su capacidad de inhibir las especies reactivas de oxígeno (Meo et al., 2017).

Diversos estudios científicos muestran que la miel de abeja sin aguijón presenta efectos terapéuticos como antidiabéticos, cicatrización de heridas, tratamiento para enfermedades en los ojos

y efectos en la fertilidad, principalmente en modelos animales y celulares (Zulkhairi Amin et al., 2018). Con relación a la cicatrización de heridas, los científicos Ng, Lye, Chan, Lau, y Ee (2017), mostraron que la combinación de la miel de abeja sin aguijón *Trigona* con el antibiótico ampicilina o con el extracto de ajo presentó mejor efecto en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* que cuando se administraban por separado, esta bacteria es la causante de las infecciones en las heridas.

Mientras que la miel Kelulut, producida por las especies del género *Trigona* previno la inducción de cáncer de colon por azoximetano (AOM) en ratas, observándose una disminución en el número total de focos de cripta aberrante (ACF), el cual es un biomarcador en el desarrollo del cáncer de colon (Yazan et al., 2016). Además, en un estudio *in vitro* realizado por Kustiawan, Puthong, Arung, y Chanchao (2014) se evaluó la citotoxicidad de la miel de abeja sin aguijón de diferentes especies, *Trigona incisa*, *Timia apicalis*, *Trigona fusco-balteata* y *Trigona fuscibasis*, en líneas celulares humanas con cáncer, teniendo mejor efecto en la citotoxicidad de las células con hepatoblastoma hepático (HepG29). Estos efectos anticancerígenos se deben principalmente a la presencia de polifenoles, como la quercetina, apigenina, crisina y luteolina. Los mecanismos implicados en la prevención del cáncer por estos polifenoles incluyen la inhibición de la proliferación celular, la modulación de las vías de señalización del cáncer y en la inducción de apoptosis de las células tumorales (Ishikawa & Kitamura, 2000; Khan et al., 2006).

Con relación en el tratamiento de enfermedades oculares, Ilechie, Kwapong, Kyei, Mate-Kole, y Darko-Takyi (2012) mostraron que la aplicación de la miel de abeja sin aguijón de la especie *Meliponula* spp., disminuía los signos inflamatorios, la duración de la infección y el tiempo para la resolución completa de la conjuntivitis bacteriana causada por *S. aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* en cerdos e incluso el efecto fue comparable con la gentamicina. En otro estudio realizado por Patricia (2002), encontró que la aplicación de la miel producida por la especie *Melipona favosa favosa* en ratones con cataratas inducidas por selenita, ayudaba a reducir en un 20% la progresión de estas. Estos efectos benéficos se deben principalmente por la presencia de polifenoles con propiedades anti-cataratas, como lo son los flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides. Mientras que la quercetina y catequina son polifenoles específicos que tienen efectos contra enfermedades oculares (S. M. Lee et al., 2010).

Otra propiedad de la miel de abeja sin aguijón es en la fertilidad, en un estudio realizado por Muhammad Rashidi Wahab (2013) se encontró que la administración de la miel Kelulut en ratas diabéticas aumentó significativamente la calidad espermática y con un efecto protector en la

espermatogénesis. Incluso en ratas no diabéticas, la administración de la miel ayudó a incrementar el recuento de espermatozoides epididimarios, la motilidad y la viabilidad del esperma.

De acuerdo con Borsato et al. (2014), la especie *Melipona marginata* presente en Brasil, su miel mostró efectos antiinflamatorios cuando era aplicada en un modelo de ratón con inflamación de oído, ya que esta disminuyó el edema del oído en un 54%, además el extracto de miel disminuyó la actividad de la mieloperoxidasa en un 75% y redujo en un 55% la producción de especies reactivas de oxígeno, moléculas relacionadas con la inflamación.

2.2.3 Propiedades antioxidantes de la miel de abeja sin aguijón

La actividad antioxidante de la miel se debe principalmente por la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, enzimas, carotenoides, aminoácidos, proteínas y minerales (Ávila et al., 2018).

Se ha reportado que la actividad antioxidante de la miel producida por las abejas meliponas es tres veces mayor comparada con la miel producida por la abeja europea e incluso cuatro veces mayor que la miel procesada (Baek et al., 2015; Gorjanović et al., 2013; Muruke, 2014). Además, Ávila et al. (2019) reportó que ocho especies de abejas sin aguijón de Brasil presentan 45% mayor capacidad antioxidante y actividad biológica comparada con la miel tradicional de *Apis Mellifera*, siendo el ácido p-cumárico, quercetina y hesperetina, los principales agentes responsables de este efecto.

En el estudio realizado por Biluca et al. (2020) ocho tipos de miel producida por el género *Meliponinae* presentaban mayormente los siguientes compuestos: ácido p-cumárico, salicílico y los flavonoles aromadendrina y taxifolina. La presencia de compuestos fenólicos también se ha reportado en otros estudios realizados con miel de abeja sin aguijón, como el estudio realizado por Sousa et al. (2016) observó la presencia del ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ferúlico, elagénico, miricetina, catequina, rutina, kaempferol, hesperetina y crisina en ocho especies del género *Meliponini* en Brasil. Otro estudio con resultados similares fue el realizado por Ranneh et al. (2018) que encontraron principalmente ácido galico, ácido cafeico, crisina y ácido 2,4-dihidroxibenzoico en la miel Kelulut del género *Trigona* en Malasia.

Mientras que Nweze et al. (2017) encontraron que la miel producida por la abeja sin aguijón *Hypotrigona sp.* presentaba un mejor capacidad antioxidante comparada con la miel de *A. Mellifera* y de *Melipona sp.*, por lo que la miel producida por las abejas sin aguijón también presentan diferencias en cuanto a su actividad antioxidante. Por ejemplo, se ha observado que la miel de *T. carbonaria*, *Melipona fasciculate*, *Melipona subnitida* y *Melipona aff. Fuscopilosa* muestran una buena capacidad

antioxidante *in vitro*, sin embargo, de estas especies de abejas sin aguijón *T. carbonaria* presenta la mejor capacidad antioxidante (P. V. Rao et al., 2016).

2.2.4 Propiedades antimicrobianas de la miel de abeja sin aguijón

Se ha observado que la miel de abeja sin aguijón, *Tetragonisca angustula* con presencia en Brasil y México posee una buena actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas como negativas, como *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e incluso frente a levaduras como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Abdullah et al., 2007; Sgariglia et al., 2010). También otro estudio realizado por Chanchao (2009), demostró propiedades antimicrobianas en la miel de abeja sin aguijón, *Trigona laeviceps* en Tailandia, inhibiendo el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, además de inhibir al hongo *Aspergillus niger* y dos levaduras, *Auriobasidium pullulans* y *C. albicans*.

En cambio en la investigación realizada por Ávila et al. (2019) demostró que la miel de abeja sin aguijón de diversas especies del género *Melipona* y *Scaptotrigona*, presentaban una mejor actividad antimicrobiana frente a bacterias gram negativas, *E. coli* y *S. typhimurium*, que frente a bacterias positivas, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Además de acuerdo con Shah, Ali, Shah, y Hayat (2019), diferentes mieles de abejas sin aguijón de Pakistán, presentaron efectos antimicrobianos frente a *E. coli*, *S. typhi*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*.

También otras especies de abejas sin aguijón han mostrado propiedades antimicrobianas, como *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* procedentes de Costa Rica, frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Zamora et al., 2014). Mientras que de acuerdo con Lani, Mohd Hasali, Zamri, Mubarak, y Suhaili (2015), la miel de abeja melipona, *Heterotrigona itama*, de Malasia presentó efectos inhibitorios frente a bacterias patógenas como *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *L. monocytogenes*.

2.3 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen una gran importancia tanto en la industria alimenticia, en la agricultura y en la industria farmacéutica. Estas bacterias se caracterizan por ser gram positivas, no formadoras de esporas, en forma de cocos o bacilos y producen ácido láctico como principal producto final del metabolismo heterofermentativo o homofermentativo (Saeed & Salam, 2013; Xu et al., 2019).

Estas bacterias se encuentran principalmente en alimentos fermentados como el yogurt, el queso, masa agria, bebidas, vino, salchichas, chucrut y aceitunas (Marco et al., 2017). Debido a su presencia en estos alimentos y a que no representan un riesgo para la salud de las personas que los consumen, estos se consideran como GRAS (Generally Recognized as Safe).

Las BAL son importantes para la producción y el desarrollo del sabor en los alimentos fermentados, ya que estas participan en la fermentación de azúcares y en la degradación de proteínas (Wedajo, 2015). Por ejemplo, en el yogurt se requiere la producción de ácido acético, compuesto formado durante la fermentación y necesario para su sabor característico (Papademas, 2014).

Mientras que su importancia en la industria farmacéutica está relacionada con la producción de probióticos, los cuales se definen como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”(FAO & OMS, 2006). Se ha observado que el uso de probióticos ayuda a disminuir los síntomas de dolor y el desbalance en la microbiota intestinal (disbiosis) en pacientes con colitis ulcerativa, síndrome de Chron y estreñimiento (Ghouri et al., 2014; Lim et al., 2018).

Las BAL se agrupan en cuatro géneros importantes, que incluyen: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Sin embargo, recientes investigaciones en taxonomía sugieren la adición de nuevos géneros, entre los que destacan: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Khalisanni Khalid, 2011; Bintsis, 2018).

2.3.1 Aplicaciones en la industria de alimentos

Dentro de las aplicaciones más importantes de las bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria se encuentra la producción de alimentos fermentados, en donde estas se emplean como cultivos iniciadores y como cultivos secundarios (Admassie, 2018).

Cuando se utilizan las BAL como cultivos iniciadores, estos desempeñan un papel muy importante en la producción de los alimentos fermentados mediante la generación de ácido láctico a través de la fermentación de azúcares (Bintsis, 2018). Entre los alimentos que utilizan estos cultivos iniciadores se encuentran el queso, el yogurt, la masa madre, el kéfir, el salami Milano, aceitunas y pozol (**Tabla II**).

Por ejemplo, en la fabricación de quesos se emplean cultivos iniciadores, como *lactococcus lactis* spp. *lactis*, *lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis*, *leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, los cuales causan una rápida acidificación de la leche mediante la producción de ácido láctico y esto afecta tanto la fabricación del queso como su composición y calidad (Bernardeau et al., 2008). Mientras que, en el yogurt, se utilizan BAL termofílicas, *Streptococcus thermophilus* y *lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, los cuales favorecerán la producción de ácido láctico y compuestos aromáticos,

causando la disminución del pH y así evitar la contaminación por microorganismos patógenos (Admassie, 2018; Donkor et al., 2007).

No solo en la industria láctea se emplean cultivos iniciadores, también en productos de panificación. La fermentación de la masa madre es el proceso más natural y de mejor rendimiento para garantizar las características sensoriales del pan, además de que las LAB ayudan a disminuir el crecimiento de moho y de acrilamida. Entre las LAB utilizadas en la masa madre se encuentran *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. sanfransiscensis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. pontis*, *L. panis* y *L. alimentarius* (Bartkiene et al., 2017; Cizeikiene et al., 2013).

En cambio, cuando se utilizan las BAL como cultivos secundarios, estas se añaden en algún punto durante la fabricación del alimento fermentado por lo que su función principal no está en la producción de ácido láctico, si no en el desarrollo del sabor y en los procesos de maduración (Bintsis, 2018; Cogan et al., 2007). Las BAL producen sustancias poliméricas extracelulares (SPEs), las cuales contribuyen a la textura, sensación en la boca, percepción del sabor y en la estabilidad de productos como el yogur, queso, crema fermentada y en postres a base de leche (Jolly et al., 2002; Xu et al., 2019).

Las SPEs están en forma de polisacáridos capsulares unidos a la célula o se liberan en el medio de crecimiento. Se ha observado que las SPEs producidas por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* aumentan la textura y viscosidad del yogurt además de disminuir la sinéresis (Doleyres et al., 2005). Además, las SPEs se han utilizado como espesantes, emulsionantes o estabilizadores naturales para mejorar la textura de los alimentos (Han et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Tabla II. Bacterias ácido lácticas utilizadas como cultivos iniciadores en varios tipos de alimentos fermentados (Bintsis, 2018).

Producto	Género de BAL
Queso (Iniciadores mesofílicos)	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> .
Queso (Iniciadores termofílicos)	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> .
Yogurt	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> .
Leches fermentadas	<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> .
Mantequilla y suero de leche	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetyllactis</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. menesteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> .
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranoformis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> , <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> .

Salami Milano	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> .
Chorizo	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> .
Aceitunas	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> .
Pan de masa fermentada	<i>Lb. sanfransiscensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>W. cibaria</i> .
Pozol	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. confusus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. raffinolactis</i>

Lc. Lactococcus, *Lb. Lactobacillus*, *Leuc. Leuconostoc*, *P. Pediococcus*, *S. Streptococcus*, *W. Weissella*.

2.3.2 Otras aplicaciones de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas también son utilizadas en la industria alimentaria como aditivos para prevenir el deterioro de los alimentos, debido a su producción de bacteriocinas y de otros compuestos con propiedades antifúngicas como ácidos, alcoholes, dióxido de carbono, diacetilo, peróxido de hidrógeno y ácido fenilacético (Gerez et al., 2009).

La producción de ácido láctico y ácido acético durante la fermentación de las BAL es una forma de inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos en los alimentos, ya que estos ácidos disminuyen el pH del medio y esto ocasiona que las actividades metabólicas de las bacterias patógenas se detengan (Admassie, 2018; Muhialdin et al., 2011).

Mientras que las bacteriocinas, son polipéptidos sintetizados ribosómicamente por algunos tipos de BAL y tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos sobre otras bacterias. El mecanismo por el que actúan es inhibiendo la biosíntesis de la pared celular o dañando la membrana de las bacterias patógenas a través de la formación de poros (Alvarez-Sieiro et al., 2016; McAuliffe, O., Ross, R., Hill, 2002).

La nisina, es la bacteriocina con mayor aplicación en la industria de alimentos, ya que esta se utiliza como aditivo en más de 50 países, principalmente en alimentos como queso procesado, productos lácteos y alimentos enlatados (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Delves-Broughton, 1996).

Otros ejemplos de bacteriocinas producidas por BAL que tienen utilidad para el control del deterioro de alimentos o para inhibir bacterias patógenas son la lacticina de *lactococci*, macedovicina de *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, reuterina de *Lactobacillus reuteri*, sakacina M de *Lactobacillus sake* 148, curvacina A, curvaticina L442 y lactocina AL705 de *Lactobacillus curvatus*

LTH1174, pediocina PA-1/AcH de *Pediococcus acidilactici* y plantaricinas de *Lactiplantibacillus plantarum* (Cheong et al., 2014; Georgalaki et al., 2013; Parada et al., 2007; Rodríguez et al., 2002).

2.4 Probióticos

La palabra probiótico deriva del latín y griego que significa “para la vida” y fue definida por primera vez en 1965, por Lilly y Stillwell como aquella sustancia producida por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro microorganismo (Iqbal et al., 2014). La definición más reciente y aceptada es la de la FAO/OMS (2006) que los define como “microorganismos vivos que confieren efecto beneficioso para la salud del hospedador, cuando se administran en cantidad adecuada”.

Diferentes sitios del tracto gastrointestinal están habitados por diversos tipos de bacterias beneficiosas y estas tienen una relación de simbiosis con el huésped. Cuando la cantidad de bacterias benéficas es mayor que las bacterias dañinas, se denomina normobiosis; en cambio cuando las bacterias patógenas se encuentran en mayor proporción que las benéficas, se conoce como disbiosis (Roberfroid et al., 2010).

Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se encuentran presentes en la membrana mucosa de las células epiteliales del intestino, donde inhiben el crecimiento y la fijación de bacterias dañinas al producir sustancias bactericidas contra esas bacterias (Holzapfel, 2005; Macfarlane et al., 2004). Normalmente, el estómago contiene 10^3 especies diferentes de bacterias, mientras que en el colon existen cerca de 10^{11} - 10^{12} UFC/g (Slavin, 2013).

La colonización del intestino comienza desde el nacimiento, cuando el bebé es expuesto por primera vez a un ambiente no estéril, posteriormente la composición bacteriana cambiará a lo largo de la vida y dependerá de diversos factores como el tipo de dieta, el genoma, el estilo de vida del huésped, así como del uso de antibióticos (George Kerry et al., 2018).

Los probióticos contribuyen a la salud intestinal al reemplazar las bacterias dañinas en la microbiota intestinal. Además, los probióticos sintetizan vitaminas, como las del complejo B (biotina y ácido fólico) y vitamina K, indispensables para la homeostasis del organismo (Chikkamath et al., 2018). De acuerdo con Chikkamath et al. (2018), entre los géneros de bacterias más utilizadas como probióticos se encuentran *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y la levadura *Saccharomyces* (**Figura 1**).

Probióticos		
Lactobacillus <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueki</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamosus</i>	Bifidobacteria <i>B. adolescentis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infants</i> <i>B. lactis</i> <i>B. longum</i>	Otras especies <i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Saccharomyces boulardii</i>

Figura 1. Géneros de bacterias usadas como probióticos (Furrie, 2005).

Las bacterias ácido lácticas más utilizadas como probióticos son *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lactiplantibacillus plantarum* (Bintsis, 2018). Mientras que las cepas de bifidobacterias empleadas como probióticos son *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis* y *B. longum* (Chikkamath et al., 2018).

Existen aproximadamente 56 especies de *Lactobacillus* y 59 especies de *Bifidobacteria* que son usadas como probióticos. Estos se encuentran disponibles en forma de cápsulas, geles, tabletas, líquidos o polvos, y están presentes en varios alimentos fermentados, como el yogurt o las bebidas lácteas (Iqbal et al., 2014).

La selección del producto probiótico dependerá del tipo de bacteria y del efecto beneficioso esperado. Además, para que un alimento sea considerado como probiótico debe cumplir con las siguientes características: producción de sustancias antimicrobianas, competencia por nutrientes, modulación del sistema inmune, resistencia a la acidez gástrica y biliar, capacidad de permanecer viables en el producto y contener entre 10^6 - 10^8 UFC/g (M. T. Sánchez et al., 2015).

Existe evidencia de que los probióticos modulan y regulan la respuesta inmune mediante la activación de genes específicos en las células del huésped, e incluso participan en la liberación de hormonas gastrointestinales y regulan el comportamiento cerebral a través de la señalización neuronal bidireccional, como parte del eje intestino-cerebro (Kristensen et al., 2016).

2.4.1 Importancia en la salud

Se ha encontrado que los probióticos ayudan a mejorar la función de la barrera intestinal, aumentando su capacidad única de competir con la microbiota patógena por la adhesión al intestino y mejorando su colonización (S. C. Rao et al., 2016). Incluso los probióticos aparte de controlar las diarreas, presentan propiedades antimicrobianas, antimutagénicas, anticancerígenas, ayudan en el tratamiento de las dislipidemias (**Figura 2**) y a mejorar la función del sistema inmune (Iqbal et al., 2014).

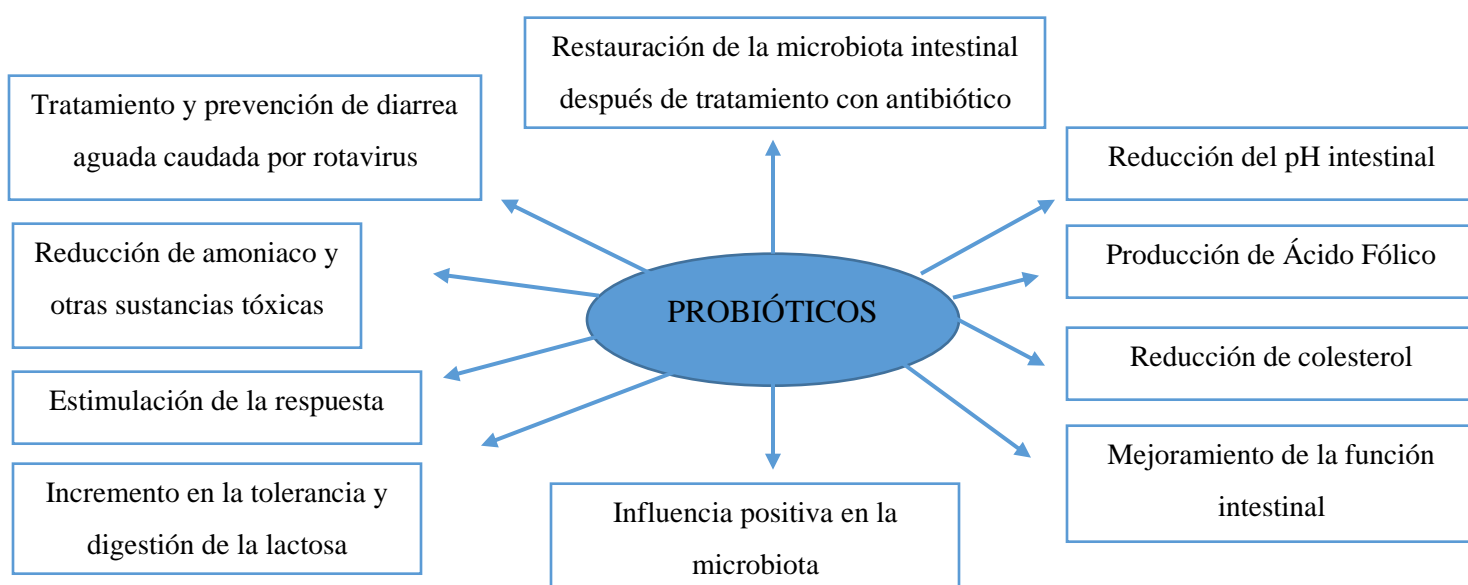


Figura 2. Usos terapéuticos de los probióticos (Fernández, Hudson, Korpela y Reyes, 2015).

Una de las principales propiedades de los probióticos es su capacidad antimicrobiana, debido a la presencia de péptidos y bacteriocinas, las cuales causan la muerte celular de los microorganismos patógenos al aumentar la permeabilidad de sus membranas y su despolarización (Simova et al., 2009). Además, existe la presencia de otros compuestos secretados por los probióticos, como el etanol, el

diacetilo, acetaldehídos y peróxido de hidrógeno, capaces de tener efectos antimicrobianos (Islam, 2016).

En un estudio *in vitro* realizado por Tejero-Sariñena, Barlow, Costabile, Gibson, y Rowland (2013), se observó que el uso de los probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium breve*, inhibieron el crecimiento de las bacterias patógenas, *Salmonella entérica*, *Serovar typhimurium* y *Clostridium difficile*. Atribuyendo el efecto antimicrobiano de los probióticos a la producción de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético, propiónico, butírico y ácido láctico, los cuales ayudan a disminuir el pH del medio.

Además, se han observado que las propiedades antimicrobianas de los probióticos, se debe a su capacidad de competir por los receptores de unión de los patógenos y por disminuir la disponibilidad de nutrientes. Incluso los probióticos estimulan la producción de defensinas, péptidos antimicrobianos catiónicos producidas por las células de Paneth en las criptas del intestino delgado y por las células epiteliales intestinales (George Kerry et al., 2018; Quijano, 2011).

2.4.1.1 Probióticos en la obesidad y en el tratamiento de dislipidemias

En el intestino están presentes dos *phylas* importantes, los Bacteroidetes (Gram-negativos) y los Firmicutes (Gram positivos). En pacientes con obesidad se ha observado un incremento de Bacteroidetes y una disminución de Firmicutes, lo que origina un estado de inflamación debido a la presencia del lipopolisacárido en las membranas de las bacterias gram negativas (Kobyliak et al., 2016; Schwartz et al., 2010).

En un estudio realizado por Bäckhed, Manchester, Semenkovich, y Gordon (2007), se encontró que los ratones libres de gérmenes trasplantados con microbiota de ratones obesos, podían replicar el fenotipo de los obesos e incluso fueron más eficientes en extraer la energía de los alimentos, favoreciendo así la acumulación de grasa.

Mientras que en el estudio de Kang et al. (2013) se observó que el uso de *Lactobacillus gasseri* BNR17, probiótico aislado de la leche materna, mostraba efectos beneficiosos al inhibir el crecimiento de tejido adiposo en ratas que eran alimentadas con una dieta alta en sacarosa y así inhibir la producción de leptina, hormona secretada por el tejido adiposo. En cambio, el uso de *Lactocaseibacillus rhamnosus* PL60 en ratones obesos, favoreció en la reducción de peso, en la reducción de la obtención de energía y en la disminución del crecimiento del tejido adiposo; los autores atribuyen este efecto debido a la producción del ácido linoleico conjugado (CLA) por parte de esta bacteria probiótica (H. Y. Lee et al., 2006).

Existen diversas investigaciones que muestran los efectos hipocolesterolémicos de los probióticos, como el de (Kießling et al., 2002) en donde 29 mujeres recibieron 300g/día de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* observándose un incremento en los niveles de HDL (lipoproteína de alta densidad) después de 21 días de consumir estas bacterias probióticas. Mientras que en el estudio de Ataie-Jafari, Larijani, Alavi Majd, & Tahbaz (2009) la intervención con 300g/día de yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en 15 pacientes durante 12 días, hubo una disminución en los niveles de colesterol total y en LDL (lipoproteína de baja densidad).

Se ha reportado que el uso de *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* favorece la reducción de colesterol debido a diferentes mecanismos observados en experimentos *in vitro*, como la asimilación del colesterol por las bacterias probióticas, la interrupción de las micelas de colesterol y la desconjugación de la actividad de las sales biliares y de la hidrolasa (Shimizu et al., 2015).

2.4.1.2 Probióticos en la Diabetes Mellitus tipo 2

Las personas con Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) también presentan una disbiosis en la microbiota intestinal, de acuerdo con Larsen et al. (2010) de 36 pacientes estudiados, 18 presentaban DMT2 los cuales tenían una distribución de la microbiota intestinal diferente de aquellos pacientes que no presentaban la enfermedad. Observándose en los pacientes con DMT2 una disminución en las bacterias de la phyla Firmicutes y un aumento de la phyla Bacteroidetes, lo que ocasionaba una disminución en la tolerancia de la glucosa.

Existen estudios en modelos animales y humanos que demuestran los efectos de los probióticos en la regulación de la glucosa, uno de ellos es el realizado por Yadav et al. (2007) quienes encontraron que el alimentar a ratas diabéticas con *dahi*, una bebida láctea fermentada que contenía *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*, retrasaba la progresión de la intolerancia a la glucosa, la hiperglicemia y la hiperinsulinemia mediante la disminución del estrés oxidativo.

Mientras que en la investigación de Asemi, Zare, Shakeri, Sabihi, & Esmailzadeh (2013), se evaluó el efecto de diferentes tipos de probióticos en la glucosa en ayunas de 54 pacientes con DMT2, de los cuales 27 recibieron un suplemento durante 8 semanas con siete tipos de probióticos: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* y *Streptococcus thermophilus*, observándose que estos pacientes no registraron un aumento en la glucosa plasmática en ayunas comparado con el grupo placebo.

Efectos similares fueron observados por Tonucci, Olbrich dos Santos, Licursi de Oliveira, Rocha Ribeiro, & Duarte Martino (2017), quienes evaluaron el efecto de una leche fermentada con bacterias probióticas, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, en 50 pacientes con DMT2, observándose un mejor control de la glucemia al disminuir los valores de hemoglobina glucosilada y una disminución significativa en los niveles de fructosamina.

Aunque no se conocen los mecanismos mediante los cuales los probióticos ayudan en la disminución de la glucosa, la modificación de la microbiota intestinal mediante la suplementación con probióticos puede ser un método para prevenir y controlar la hiperglucemia (Ruan et al., 2015).

2.4.1.3 Probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), está conformada por dos patologías la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, la primera se caracteriza por afectar y causar la inflamación de cualquier parte del tracto gastrointestinal y la segunda por afectar únicamente la mucosa y submucosa del colon (Jonkers & Stockbrügger, 2007; Loftus, 2004). Los síntomas principales que se presentan en la enfermedad de Crohn son diarrea, pérdida de peso y dolor abdominal, mientras que en la colitis ulcerativa se presentan síntomas de diarrea y sangrados (Palumbo et al., 2016).

La etiología de la EII es aún desconocida, pero se ha asociado con una disbiosis en la microbiota intestinal y a una inadecuada producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el acetato, butirato y propionato, además estos AGCC presentan propiedades antiinflamatorias y favorecen la función del colon. Por lo tanto, la suplementación con probióticos sería una buena alternativa para aumentar la producción de estos AGCC y así ayudar en la disminución de los síntomas de la EII (Currò et al., 2017).

Existen diversos estudios en humanos que demuestran los efectos benéficos de los probióticos en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerativas. Entre estos se encuentran el realizado por Palumbo et al. (2016), en 60 pacientes con colitis ulcerativa de los cuales 30 pacientes fueron tratados con probióticos (*Ligilactobacillus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidus*) durante 2 años, observándose una mejoría en los síntomas comparado con el grupo control, presentando una disminución en la severidad de la enfermedad, mejorando la mucosa intestinal y disminuyendo los episodios de sangrado. Efectos similares fueron observados en el estudio de Amiriani et al. (2020) quienes suplementaron a 60 pacientes que presentaban colitis ulcerativa con cápsulas de Lactocare (*Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* y

Streptococcus thermophiles) durante 8 semanas, observándose una disminución en la frecuencia de la inflamación, menor número de evacuaciones con sangre y una mejoría general en la sintomatología de la enfermedad.

Mientras que en la enfermedad de Crohn se ha encontrado que el uso de probióticos como *Bifidobacterium breve*, *Lactocaseibacillus casei* y *Bifidobacterium longum* en pacientes con esta enfermedad durante 1 año, presentaban una disminución en los episodios de diarrea, de dolor abdominal y de inflamación (Fujimori et al., 2007). Además, en otra investigación realizada por Yilmaz, Enver Dolar, & Özpınar (2019), se observó que los pacientes con enfermedad de Crohn que consumían Kefir (*L. pentosus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. kefir*, y *L. lindneri*) durante 4 semanas mejoraron los síntomas de la enfermedad, disminuyendo los síntomas de inflamación y aumentando la sensación de bienestar del paciente.

2.4.1.4 Probióticos en el tratamiento de alergias

En los últimos años han incrementado los casos de personas con enfermedades alérgicas causadas por un mal funcionamiento del sistema inmunológico en el mundo, convirtiéndose en un problema de salud. Debido a esto, se han aumentado el número de investigaciones relacionadas a conocer las causas de este tipo de enfermedades (Hong et al., 2016).

Existen diversas investigaciones que han mostrado el uso benéfico de los probióticos en los procesos alérgicos, sin embargo, la mayoría son realizadas en modelos animales (Furrie, 2005). Por ejemplo, en un estudio *in vitro* se observó que ratas y ratones tratados con *Lactiplantibacillus plantarum* 67, se inhibía la respuesta inflamatoria alérgica al disminuir la expresión de citocinas como la IL-1 β , IL-6 e IL-10. Los investigadores concluyeron que *L. plantarum* tiene el potencial de prevenir trastornos inmunes relacionados con la alergia (Song et al., 2016).

En otro estudio realizado en ratones, se encontró que *L. plantarum* 06CC2 aliviaba significativamente los síntomas alérgicos y disminuía los niveles de inmunoglobulina E total, además incrementó significativamente la secreción de interferón- γ e IL-4, moléculas implicadas en aliviar los síntomas de las alergias (Takeda et al., 2014). Mientras que en otro estudio elaborado por Wang et al. (2020) en ratones con asma alérgica, encontraron que cuando eran tratados con *Bifidobacterium infantis* disminuía la infiltración de células inflamatorias inducidas por anticuerpos específicos, además de disminuir los niveles de IgE, promover a Th1 e inhibir las respuestas inmunes de Th2.

Dentro de los estudios realizados en humanos, se encuentra el de (Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T. & Isolauri, 2007) donde se observó que el consumir *Lactocaseibacillus rhamnosus* desde

las últimas semanas de gestación hasta los 7 años de vida favorecía la disminución del riesgo acumulado de desarrollar eccema comparado con el grupo control (sin uso del probiótico).

2.5 Alimentos fermentados

La fermentación es un proceso que se ha utilizado desde tiempos ancestrales y se ha empleado para preservar y aumentar el tiempo de vida útil, el sabor, la textura y las propiedades funcionales de los alimentos (Hutkins, 2008). Recientemente, se ha incrementado el consumo de alimentos fermentados que contienen microorganismos vivos debido a sus propiedades benéficas para la prevención y el tratamiento de enfermedades en los seres humanos (Marco et al., 2017).

El proceso de fermentación puede categorizarse por los metabolitos primarios y por los microorganismos empleados. Aunque también se puede describir en función de los sustratos utilizados, como las carnes, pescados, lácteos, verduras, cereales, leguminosas y frutas. Las materias primas que contienen altas concentraciones de monosacáridos y disacáridos son fermentadas por bacterias ácido lácticas (Admassie, 2018; Marco et al., 2017).

Diferentes géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* suelen emplearse en la elaboración de los productos fermentados (**Tabla II**) e incluso otros tipos de microorganismos como levaduras y hongos (Rezac et al., 2018).

La fermentación hace que los alimentos sean más sabrosos al mejorar su aroma y sabor, e incluso favorece a que estos mejoren su calidad nutricional al aumentar la biodisponibilidad de minerales como el hierro y proteínas al reducir antinutrientes como el ácido fítico y taninos, e incluso aumenta la biodisponibilidad de las vitaminas presentes en los alimentos (Blandino et al., 2003; Santos et al., 2008).

Recientemente productos fermentados comercialmente se utilizan como portadores de bacterias probióticas. Un alimento para considerarse como probiótico debe contener aproximadamente 10^6 - 10^7 por ml o g de células viables en el momento del consumo, con la finalidad de que el producto proporcione un efecto terapéutico. Sin embargo, esta concentración de microorganismos dependerá de las regulaciones cada país (Ranadheera et al., 2017; Rezac et al., 2018).

En Europa para que un yogurt sea considerado como producto que facilita la digestión de la lactosa debe contener mínimo 10^8 UFC/g (Panel et al., 2010), en cambio en Australia y Nueva Zelanda sólo se requiere un mínimo de 10^6 UFC/g (Commonwealth of Australia Gazette, 2015), mientras que en México debe contener como mínimo 10^7 UFC/g (NOM 181, 2010).

Diversos estudios en humanos han mostrado que el consumo de alimentos fermentados como el yogurt favorece a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, de diabetes mellitus tipo 2

(Chen et al., 2014; Eussen et al., 2016), mientras que otros han señalado que el consumo del kimchi, alimento fermentado producido a partir de la col china, disminuye la prevalencia de diabetes y obesidad (An et al., 2013).

En la enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades relacionadas con el sistema inmune como la artritis y la esclerosis se ha propuesto el consumo de alimentos fermentados para mejorar los síntomas de estas enfermedades, sin embargo, no se tienen suficientes estudios que demuestren estos efectos (Marco et al., 2017).

2.5.1 Productos lácteos fermentados

De acuerdo con la Federación Internacional de Productos lácteos (2011), un producto lácteo fermentado es aquel que ha sido preparado a partir de leche desnatada o no desnatada con cultivos específicos y los microorganismos se mantienen viables hasta que el producto este a la venta y no debe contener bacterias patógenas.

Kumara (2015) menciona que los productos lácteos fermentados utilizados en el mundo pueden clasificarse en tres categorías: La primera incluye a aquellos con un sabor moderadamente agrio y aroma agradable (leche cultivada), la segunda a aquellos que tienen un sabor ácido o muy ácido (cuajada, yogurt) y la tercera a los alimentos que producen alcohol más ácido láctico (kéfir y kumis).

En el mundo existen más de 400 nombres genéricos de alimentos lácteos fermentados tanto de forma tradicional como industrializados, su diferencia radica en el tipo de leche utilizada, el tratamiento que se les realiza, el proceso de fermentación y el tipo de procesamiento que se le realice al producto (Papadopoulou et al., 2019; Tamime et al., 2011).

La cuajada, el yogur, el suero de mantequilla cultivado, lassi (bebida del norte de India que utiliza yogurt), leche agria, shrikhand (platillo dulce de la India elaborado a partir del dahi colado), kumis (bebida láctea hecha a partir del kéfir), Kéfir (bebida hecha a partir de bacterias ácido lácticas y levaduras), leben (bebida láctea del medio oriente que utiliza leche de vaca, de búfalo o de oveja para producirla) y los quesos son los productos lácteos fermentados más consumidos en el mundo (Kumara, 2015; Panesar, 2011).

En la **figura 3** se muestra el procedimiento general para la preparación de los alimentos lácteos fermentados. Durante el proceso de fermentación algunas propiedades químicas y físicas ocurren debido al crecimiento y producción de las bacterias ácido lácticas que son empleadas principalmente como cultivos iniciadores (Panesar, 2011).



Figura 3. Pasos generales para la preparación de alimentos lácteos fermentados (Panesar, 2011).

Se ha observado que el consumo de alimentos lácteos fermentados ayuda a mejorar el estado de salud de las personas, debido a que se les atribuyen diversos beneficios como mejorar el sistema inmune, tener propiedades antimicrobianas y por lo tanto a disminuir la prevalencia de enfermedades gastrointestinales, además de tener propiedades antioxidantes y ayudar en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Fernández et al., 2015; Granato et al., 2010; Homayouni et al., 2012).

2.5.2 Bebidas lácteas fermentadas

Las bebidas lácteas fermentadas son producto de la fermentación de la leche por las bacterias ácido lácticas. Estos productos pueden clasificarse en no alcohólicos y alcohólicos suaves; las bebidas lácteas fermentadas no alcohólicas incluyen a la leche ácida, lassi, leche ácida, leben, ayran, chal o shubat y calpis (Kumara, 2015). Mientras que en las bebidas lácteas fermentadas alcohólicas se encuentran el kéfir y kumis (Marsh et al., 2014).

Lassi es una bebida láctea fermentada tradicional de la India, de color blanco y consistencia viscosa, de sabor dulce y ligeramente ácido, con un rico aroma. Para su preparación se utilizan dos cultivos iniciadores, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, además se le suele

añadir *Lactococcus* para mejorar el producto final al favorecer la separación controlada del suero, mejorar la viscosidad, el sabor, la consistencia y el color (Rasane et al., 2017).

Mientras que el kéfir es una bebida láctea fermentada elaborada a partir de fermentación ácido láctica y alcohólica, tiene sus orígenes en las montañas del Cáucaso y en los últimos años ha adquirido gran popularidad a nivel mundial; en Estados Unidos su mercado tiene un valor aproximado de 78.7 millones de euros. Para su elaboración se combinan tanto bacterias como levaduras, las cuales están unidas dentro de una matriz de polisacáridos conocida como “granos” de kéfir, la cual es rica en ácido fólico (Kıvanç & Yapıcı, 2015; Marsh et al., 2014).

Otra bebida elaborada a partir de fermentación ácido láctica y alcohólica es el koumiss, consumida principalmente en Asia y en algunas partes de Rusia, es muy similar al kéfir su única diferencia es que carece de una matriz de inoculación sólida y su leche se fermenta por decantación o de forma natural (Marsh et al., 2014). Para su elaboración la leche se calienta a 90°C-92°C por cinco minutos, después se enfría a 26°C-28°C, a esa temperatura se agregan los cultivos bacterianos (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) para su fermentación; posteriormente se enfría a 20°C y se agita durante una a dos horas y finalmente se envasa para dejarse madurar por uno a tres días (Kumara, 2015).

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de investigación de Ciencias Biológicas de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP).

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

La miel de abeja producida por la especie (*Scaptotrigona mexicana*) utilizada en este estudio se obtuvo de la región de Cuetzalan, por medio de un productor local. La miel se almacenó a temperatura ambiente (25°C) en recipientes de vidrio hasta el momento de su análisis. Las bacterias patógenas de interés alimentario utilizadas en esta investigación (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. flexneri*) fueron obtenidas del laboratorio de investigación de Ciencias Biológicas de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP).

3.2 Métodos

En la **figura 4** se muestra la metodología utilizada para la identificación de las BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana*. Primero se realizó el aislamiento de las BAL utilizando diferentes tratamientos (MRS, MRS + glucosa 1%, MRS + glucosa 1% + manitol 1.2% y MRS+ glucosa 1% + manitol 1.2% + HCl a pH4, M17) con la finalidad de obtener cultivos puros. Posteriormente se realizó la identificación de las BAL mediante la tinción de gram con la finalidad de observar bacterias gram positivas (coloración azul-púrpura) y se realizó la prueba de catalasa con el objetivo de identificar aquellas bacterias que fueran catalasa negativas (no hay formación de burbujeo).

Después para evaluar la actividad antimicrobiana de las BAL seleccionadas frente a las bacterias patógenas de interés alimentario mencionadas anteriormente, se llevó a cabo el método de difusión de disco y se determinó la actividad antimicrobiana del sobrenadante utilizando microplacas de 96 pocillos. Una vez identificadas las BAL con actividad antimicrobiana, estas se amplificaron mediante el método molecular de PCR del gen 16S y el producto de PCR se mandó a secuenciar.

Finalmente, cuando se obtuvieron las secuencias estas se alinearon y corrigieron mediante el programa Bioedit y se compararon con otras secuencias mediante el programa de BLASTn con la finalidad de hacer la identificación de las BAL. Debido a que había un alto porcentaje de similitud entre dos especies de BAL, éstas se identificaron mediante la prueba de fermentación de azúcares.

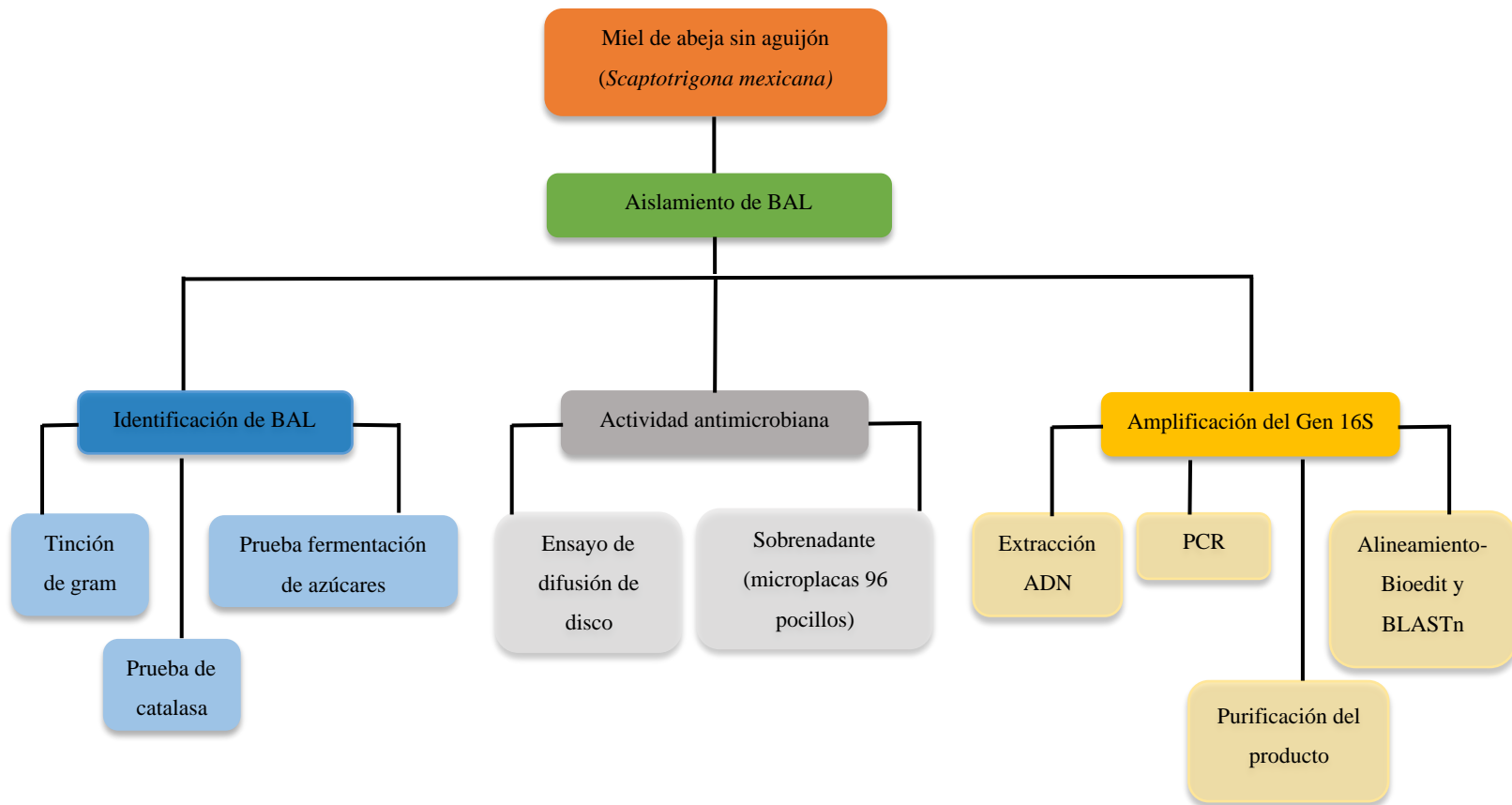


Figura 4. Metodología para la identificación de BAL presentes en la miel de abeja sin agujón (*Scaptotrigona mexicana*).

3.2.1 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) de la miel.

El aislamiento de las BAL de la miel de abeja sin agujón se realizó mediante algunas modificaciones de la metodología descrita por (Aween et al., 2012). Se colocó 1 g de miel en 9 mL de caldo Man, Rogosa and Sharpe (MRS), 1 g de miel en 9 mL de caldo MRS (Merck, Alemania) + glucosa (Reasol, México) 1% (M2), 1 g de miel en caldo MRS + glucosa 1% + manitol (Karal, México) 1.2% (M3) y 1 g de miel en Caldo MRS+ glucosa 1% + manitol 1.2% + HCl (J.T. Barker, Estados Unidos) a pH4 (M4). Las diferentes muestras se incubaron a 37°C durante 48 horas bajo condiciones anaerobias.

De cada una de las muestras, se tomó 1 mL de fermentado en 9 mL de solución salina al 0.9% (Pisa, México), se realizaron diluciones seriadas, colocándose 100 µL en placas con agar MRS (M1), agar MRS (Merck, Alemania) + glucosa 1% (M2), agar MRS+ glucosa 1%+ manitol 1.2% (M3) y Agar MRS + glucosa 1%+ manitol 1.2%+ HCl a pH4 (M4) y agar M17 (M5). Las placas se incubaron a 32°C durante 48 horas bajo condiciones anaerobias. Con la finalidad de obtener cultivos puros de

BAL, se tomaron colonias aisladas de cada una de las muestras y se sembraron mediante estría cruzada (Figura 5).

Para favorecer el crecimiento de las BAL en el caldo MRS, que es el medio de cultivo selectivo para el crecimiento de este tipo de bacterias, se le adicionó glucosa y manitol debido a que se ha reportado un aumento en el crecimiento en medios suplementados con azúcares debido a que la miel contiene néctar y polen rico en azúcares. Además, se decidió añadir manitol al medio para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas, ya que estas son incapaces de metabolizar el manitol de forma rápida o en su totalidad (Lamei et al., 2017).

De igual forma, para inhibir el crecimiento de bacterias formadoras de esporas, se decidió acidificar el medio MRS y para obtener únicamente BAL e inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas y levaduras se utilizó el agar M17 (Merck, Alemania), el cual es un medio rico en nutrientes pero que carece de azúcares simples, como la dextrosa presente en el agar MRS el cual es fácilmente metabolizado por la mayoría de las bacterias y levaduras (Da Silva et al., 2013; Hayek et al., 2019).

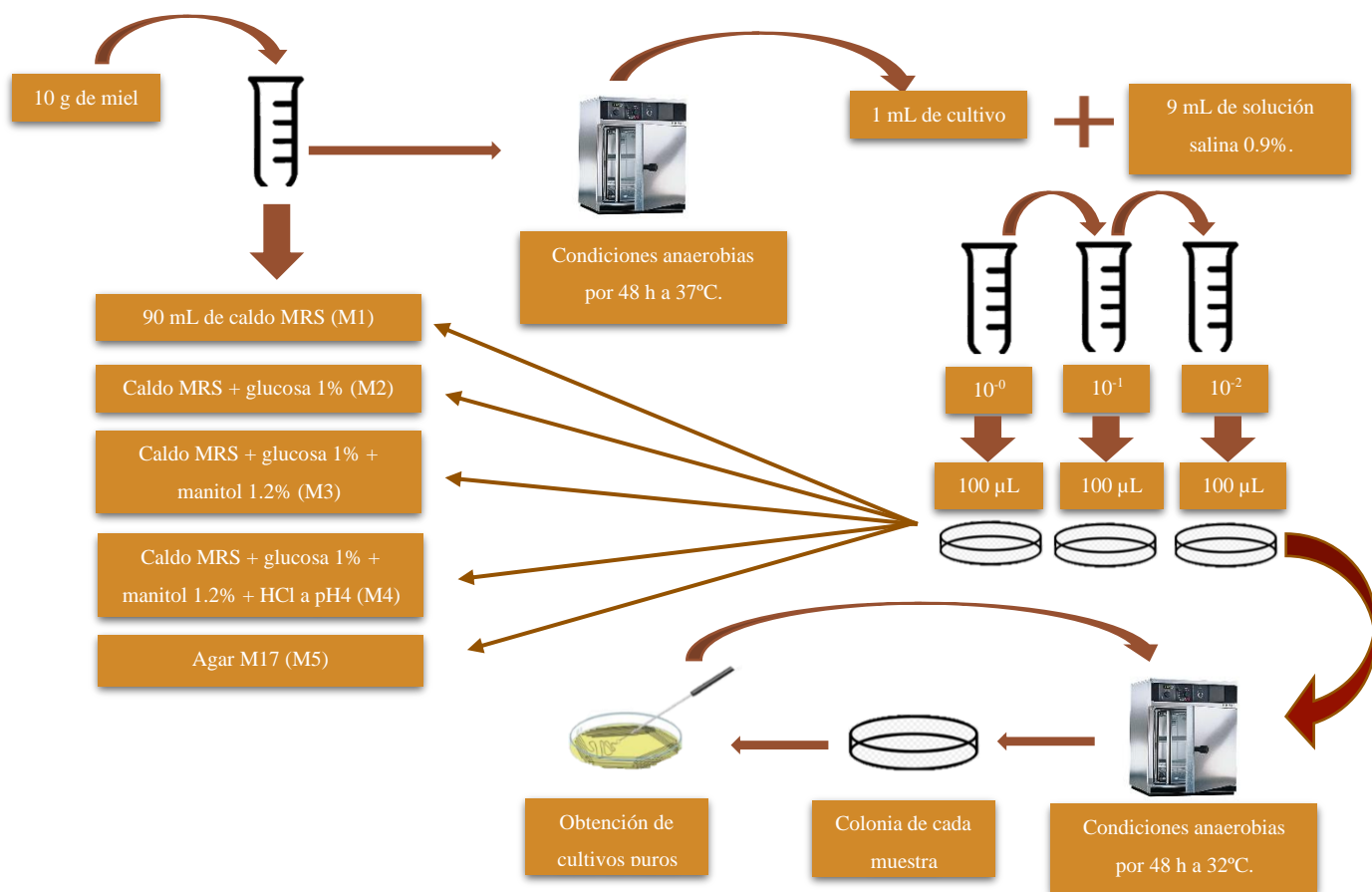


Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de BAL presentes en la miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*) y los diferentes medios utilizados.

3.2.2 Identificación de BAL.

Con la finalidad de identificar las BAL, primero se realizó la técnica de tinción de gram para cada una de las bacterias aisladas en las diferentes muestras. Esta técnica permitió distinguir las bacterias gram positivas de las gram negativas y además observar la morfología de las bacterias, en cuanto a su forma y coloración (Coico, 2005).

Posteriormente, se aplicó la prueba bioquímica de la catalasa para identificar aquellas bacterias que fueran catalasa negativa, ya que la catalasa es una enzima que únicamente está presente en las bacterias anaerobias y esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Reiner, 2010), provocando así la formación de burbujas (catalasa positiva).

Las bacterias que fueron gram positivas (coloración azul-púrpura) y catalasa negativas, y que además presentaron actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas, se identificaron mediante el método molecular de PCR (amplificación del gen 16s) para conocer la especie de BAL presente en cada muestra. Finalmente, estas BAL se colocaron en tubos para criogenizar con 20% de glicerol y se almacenaron en el ultracongelador a -80°C (Lani et al., 2015).

3.2.2.1 Tinción de gram.

Las BAL se caracterizan por ser bacterias gram positivas (tinción azul-púrpura) por lo que para su identificación se utilizó la tinción de gram. Primero se tomó una colonia aislada de cada una de las muestras y se frotó en un portaobjetos. Después para fijar la colonia en el portaobjetos, este se pasó de forma rápida por el mechero.

Posteriormente, sobre la colonia fijada se colocaron unas gotas de cristal violeta (HYCEL, México) por 1 minuto, posteriormente se agregaron unas gotas de yodo (HYCEL, México) por 1 minuto, después se agregó alcohol acetona (HYCEL, México) por 30 segundos, y finalmente se agregó safranina (HYCEL, México) por 1 minuto; entre cada reactivo se enjuagó con agua destilada.

A cada portaobjetos se le puso un cubreobjetos, para colocarlo en el microscopio óptico. Primero se identificaron usando el lente de 40x y finalmente se utilizó aceite de inmersión 100x para observar la morfología y tinción de las bacterias (Coico, 2005).

3.2.2.2 Prueba de catalasa.

Después de seleccionar aquellas muestras con bacterias gram positivas (medio MRS, medio MRS+ glucosa 1%+ manitol 1.2%, medio M17 y medio M17 a MRS) se realizó la prueba de catalasa, la cual consistió en tomar una colonia de BAL y fijarla en el portaobjetos, como se describió previamente. Después, a esta colonia fijada se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% (Jaloma, México) con el objetivo de identificar aquellas que fueran catalasa negativa debido a que las BAL, al ser bacterias anaeróbicas no tienen la enzima catalasa por lo que no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Reiner, 2010).

3.2.3 Actividad antimicrobiana.

Se han descrito distintos métodos para evaluar las propiedades antimicrobianas de la miel, entre estos se encuentra el método de difusión en agar el cual se puede clasificar en el ensayo de difusión en disco y en el ensayo de difusión de pozos en agar; otro método que existe es el del método de dilución que incluye a la dilución en agar y la dilución en caldo, así como el método de placas de gradiente como lo es el sistemas de cuñas y el revestimiento en espiral (Fidaleo et al., 2011; Voidarou et al., 2011).

Con el objetivo de conocer con exactitud la actividad antimicrobiana de la miel frente a diferentes microorganismos patógenos, es importante primero realizar el método de difusión en disco, ya que es un método sencillo y barato que permite identificar aquellas BAL que muestran actividad antimicrobiana y posteriormente aplicar el método de dilución en caldo porque este método es fácil y útil para obtener las concentraciones mínimas antimicrobianas y bactericidas (Osés et al., 2016).

3.2.3.1 Método de difusión en disco.

Mediante el método Kirby-Bauer se realizó el antibiograma, para el cual primero se inocularon 500 μ L de las bacterias patógenas (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. flexneri*) con una concentración de 10^6 - 10^8 UFC/mL en tubos estériles con 9.5 mL de caldo nutritivo (Bioxon, México) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al mismo tiempo, se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas los sensidiscos en 3mL de cada BAL aislada y en 3mL de caldo MRS y en caldo MRS+ glucosa 1%+ manitol 1.2% (controles).

Al día siguiente, en cada placa con agar nutritivo (Bioxon, México) se colocaron 200 μ L de los patógenos de interés alimentario y con un hisopo estéril se frotó toda la placa para tener una dispersión uniforme del inóculo en toda la superficie, se dejó secar durante 10 min. Después, cada placa se dividió en 6 colocándose en cada división los sensidiscos tratados con las BAL y con los

controles, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se midió el halo de inhibición con un vernier digital y el experimento se realizó por duplicado (**Figura 6**).

El grado de inhibición de las BAL frente a las bacterias patógenas se consideró de acuerdo con lo descrito por Shokryazdan et al. (2014): Inhibiciones fuertes (zonas de inhibición de más de 20 mm), inhibiciones intermedias (de 10 a 20 mm) e inhibiciones bajas (de menos de 10 mm).

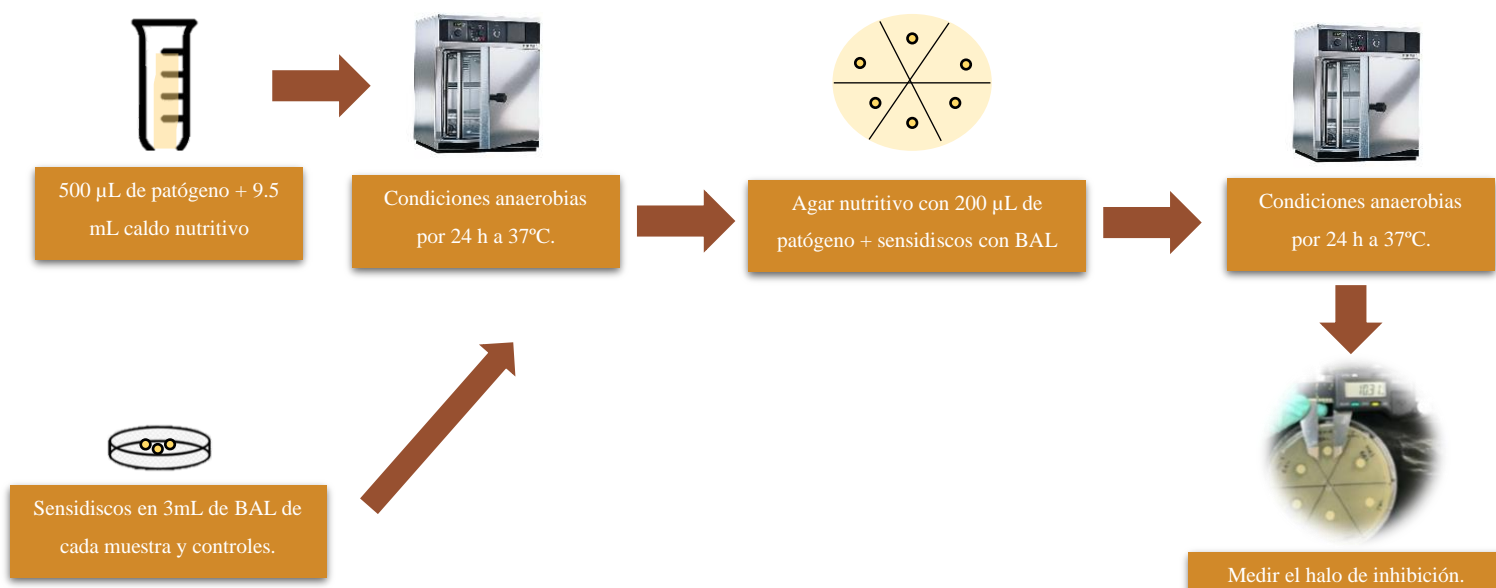


Figura 6. Procedimiento para el método de difusión en disco.

3.2.3.2 Actividad antimicrobiana del sobrenadante (microplacas de 96 pocillos).

Para esta prueba las BAL aisladas en las diferentes muestras (MRS, MRS + glc 1% + mani 1.2%, M17 y M17-MRS) y en los grupos control se pasaron por filtros pirinola con una membrana de 0.45 µm, utilizando jeringas de 3 mL, vertiendo únicamente 2 mL de las BAL y el filtrado se colocó en tubos eppendorff de 2mL.

Posteriormente, se midió la densidad óptica de los patógenos utilizando un espectrofotómetro (VelaQuin, México) y se hicieron diferentes diluciones con la finalidad de tener una concentración de 10^6 - 10^8 UFC/mL (absorbancia entre 0.4-0.8). Finalmente, se prepararon las microplacas de 96 pocillos de la siguiente forma: 200 µl de Muller Hilton (Blanco), 180 µl de Muller Hilton (BD Difco, Estados Unidos) + 20 µl Patógeno (Control positivo), 180 µl de Muller Hilton+ 20 µl de BAL- 20 µl+ después agregar 20 µl Patógeno (Dilución 1 BAL), 180 µl de Muller Hilton + 20 µl de dilución 1- 20 µl +

después agregar 20 µl Patógeno (Dilución 2 BAL) y 180 µl de Muller Hilton + 20 µl de dilución 2 – 20 µl+ después agregar 20 µl Patógeno (Dilución 3 BAL). Se realizaron 3 triplicados de cada control negativo y de cada dilución.

Se prepararon 4 microplacas de 96 pocillos, una microplaca por BAL, cada una con los 5 patógenos de interés alimentario antes mencionados (**Figura 7**). Estas microplacas se incubaron durante 24 horas y finalmente se midió la absorbancia con un espectrofotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Estados Unidos). El porcentaje (%) de inhibición del crecimiento bacteriano se determinó mediante la **ecuación 1**:

$$[(Ac-At)/Ac] \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

Donde Ac es el promedio de las réplicas de las abosorbancias de los controles negativos y At es el promedio de las réplicas de las abosorbancias de las muestras (Wang et al., 2010).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLA	Control negativo	CP1 <i>E. coli</i>	Dilución 1 <i>E. coli</i>	Dilución 1 <i>E. coli</i>	Dilución 1 <i>E. coli</i>	CP2 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 1 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 1 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 1 <i>S. typhimurium</i>	R	R
B	BLA	Control negativo	CP1 <i>E. coli</i>	Dilución 2 <i>E. coli</i>	Dilución 2 <i>E. coli</i>	Dilución 2 <i>E. coli</i>	CP2 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 2 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 2 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 2 <i>S. typhimurium</i>	R	R
C	BLA	Control negativo	CP1 <i>E. coli</i>	Dilución 3 <i>E. coli</i>	Dilución 3 <i>E. coli</i>	Dilución 3 <i>E. coli</i>	CP2 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 3 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 3 <i>S. typhimurium</i>	Dilución 3 <i>S. typhimurium</i>	R	R
D	CP3 <i>S. aureus</i>	Dilución 1 <i>S. aureus</i>	Dilución 1 <i>S. aureus</i>	Dilución 1 <i>S. aureus</i>	CP4 <i>S. flexneri</i>	Dilución 1 <i>S. flexneri</i>	Dilución 1 <i>S. flexneri</i>	Dilución 1 <i>S. flexneri</i>	CP5 <i>E. fecalis</i>	Dilución 1 <i>E. fecalis</i>	Dilución 1 <i>E. fecalis</i>	Dilución 1 <i>E. fecalis</i>
E	CP3 <i>S. aureus</i>	Dilución 2 <i>S. aureus</i>	Dilución 2 <i>S. aureus</i>	Dilución 2 <i>S. aureus</i>	CP4 <i>S. flexneri</i>	Dilución 2 <i>S. flexneri</i>	Dilución 2 <i>S. flexneri</i>	Dilución 2 <i>S. flexneri</i>	CP5 <i>E. fecalis</i>	Dilución 2 <i>E. fecalis</i>	Dilución 2 <i>E. fecalis</i>	Dilución 2 <i>E. fecalis</i>
F	CP3 <i>S. aureus</i>	Dilución 3 <i>S. aureus</i>	Dilución 3 <i>S. aureus</i>	Dilución 3 <i>S. aureus</i>	CP4 <i>S. flexneri</i>	Dilución 3 <i>S. flexneri</i>	Dilución 3 <i>S. flexneri</i>	Dilución 3 <i>S. flexneri</i>	CP5 <i>E. fecalis</i>	Dilución 3 <i>E. fecalis</i>	Dilución 3 <i>E. fecalis</i>	Dilución 3 <i>E. fecalis</i>
G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

1. BLANCO: 200 µl de Muller Hilton.
2. CONTROL negativo: 180 µl de Muller Hilton + 20 µl BAL 1.
3. CONTROL positivo (CP): 180 µl de Muller Hilton + 20 µl Patógeno. → Son 5 patógenos.
4. BAL(Dilución 1) : 180 µl de Muller Hilton+ 20 µl de BAL- 20 µl+ después agregar 20 µl Patógeno.
5. Dilución 2: 180 µl de Muller Hilton + 20 µl de dilución 1- 20 µl + después agregar 20 µl Patógeno.
6. Dilución 3: 180 µl de Muller Hilton + 20 µl de dilución 2 – 20 µl+ después agregar 20 µl Patógeno.

Figura 7. Diseño de las microplacas (96 pocillos) para evaluar la actividad antimicrobiana del sobrenadante.

3.2.4 Método molecular de PCR (amplificación del gen 16S).

Primero, se realizó la extracción de ADN de las bacterias aisladas en el medio MRS, en el medio MRS+ glucosa 1%+ manitol 1.2%, en el medio M17 y en el medio M17 a MRS. Para la extracción del ADN, se siguieron las indicaciones del DNeasy UltraClean Microbial Kit. Para comprobar la extracción de ADN se realizó una electroforesis, para la cual se preparó un gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1x.

Después se realizó la amplificación del fragmento de 518pb del gen 16S rRNA mediante la PCR y utilizando dos primers, el primer forward 27 F (5'-AGAGATTGATCCTGGCTCTG-3') y el primer reverse 142R (5'-GGTTTCCTTGTTACGACAT-3'). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, Estados Unidos) y se usó un volumen de reacción de 20 µL: 1 µL de ADN template, 0.4 µL de Primer mix (10mM), PrimeSTAR max 10 µL y agua Milli-Q 8.6 µL. Posteriormente, se establecieron las condiciones de la PCR: Desnaturalización inicial a 98°C por 2 minutos, desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, desnaturalización a 48°C por 15 segundos, desnaturalización a 72°C por 12 segundos durante 28 ciclos, después la extensión a 72°C durante 5 minutos, y finalmente la espera a 4°C por 59 minutos. Para comprobar la PCR, se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1x.

Con la finalidad de mandar a secuenciar las muestras, se realizó la purificación del producto PCR siguiendo las instrucciones del QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (Qiagen, Alemania). Finalmente, se cuantificó la cantidad de ADN en las muestras mediante fluorimetría, las cuales para poder ser secuenciadas debían tener como mínimo 25 ng/µL. Todas las muestras se secuenciaron por triplicado.

Una vez obtenidas las secuencias por parte del laboratorio LANGEBIO-CINVESTAV, estas se corrigieron y alinearon mediante el programa Bioedit 7.1.3 (Hall 1999) para deducir la secuencia correcta y después la secuencia de nucleótidos se alineó con la herramienta BLASTN para su comparación con otros aislados disponibles en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y así confirmar la especie de BAL identificada.

3.2.4.1 Extracción de ADN.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción DNeasy ultraclean microbial (QIAGEN, Alemania), para lo cual, primero se añadió 1.8 mL de cultivo microbiano a un collection tube de 2 mL, se centrifugó a 10,000 g por segundo a temperatura ambiente y se removió todo el sobrenadante con puntas.

Después se resuspendió el pellet en 300 μ L de Power bead solution y se homogeneizó en un vórtex. Posteriormente, se transfirió a un power bead tube, al cual se le añadieron 50 μ L de SL, este se colocó en el vórtex a velocidad máxima por 10 minutos. Después, se centrifugaron a un máximo de 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente.

A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2mL y se le añadió 100 μ L de IRS y se colocó en el vórtex por 5 segundos, incubación a 4°C por 5 minutos. Se continuó con una centrifugación a 10,000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. Evitando el pellet, se transfirió el sobrenadante a un collection tube de 2mL limpio, se le añadió 900 μ L de SB al sobrenadante y se vortexó por 5 segundos.

A continuación, se cargaron 700 μ L a un MB Spin colum y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el flujo y se añadió el sobrenadante restante a la MB spin colum y centrifugar a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se agregaron 300 μ L de CB y centrifugar 10,000g por 1 minuto a temperatura ambiente. Nuevamente, se descartó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000g por 1 minuto a temperatura ambiente.

Finalmente, se colocó el MB Spin colum en un nuevo collection tube de 2 mL. Se añadió 50 μ L de EB al centro de la membrana y se centrifugó a 10,000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. Se descartó la columna y se guardó el ADN a -20°C.

3.2.4.2 Electroforesis para comprobar extracción de ADN.

Para comprobar la extracción de ADN se prepararon 40 mL de gel de agarosa (Karal, México) al 0.8 % en buffer TAE tx (Karal, México). Después, se mezcló y se calentó por 15 segundos en el microondas, se agitó y se calentó nuevamente por 15 segundos y se dejó enfriar. Se montó la cámara de electroforesis (BIO-RAD, Estados Unidos) y se agregó la agarosa evitando la formación de burbujas dejándose enfriar por 15 minutos.

Posteriormente, se quitó el cepillo y se llenó la cámara de electroforesis con buffer TAE hasta cubrir completamente el gel. Se cargaron los pozos de la siguiente forma (**Figura 8 a-b**): en el primero pocillo se puso el marcador de peso molecular (ladder). En los pozos siguientes se agregaron las muestras de ADN de las BAL con colorante. La proporción de colorante que se puso a la muestra fue 1:5.

Finalmente, se corrió el gel a 110 volts por 50 min y se reveló el gel en el transiluminador (el gel antes se colocó en bromuro, se agitó por 10 minutos y se enjuagó con agua por 5 minutos).

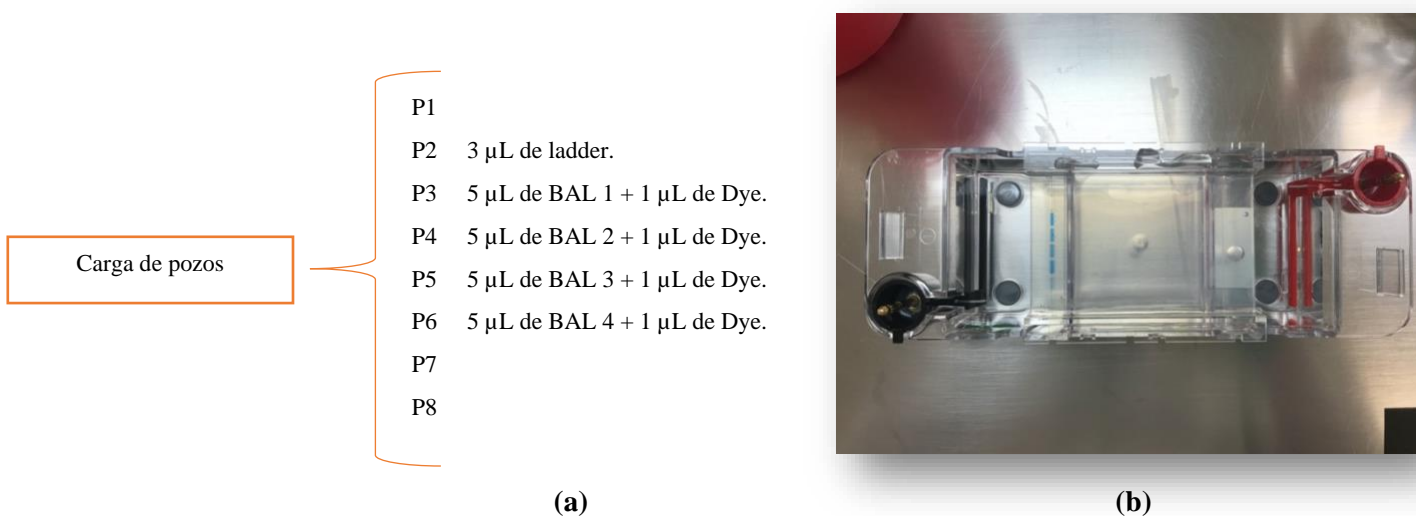


Figura 8. Esquema que muestra la forma en que se cargaron los pozos en el gel de electroforesis (a) e imagen del gel con las muestras de BAL y ladder en los pozos (b).

3.2.4.3 Pasos para la PCR, Gen 16S 27F 1492R.

Para la PCR la muestra de ADN se diluyó 10x (10 μ L de ADN en 90 μ L de Agua miliQ) y se preparó la siguiente mezcla de reacción:

DNA template	1 μ L
Primer mix (10mM)	0.4 μ L \rightarrow Mezcla de primers 27F y 1492 R.
PrimeStar max	10 μ L \rightarrow Polimerasa.
Agua miliQ	8.6 μ L

Y se ajustaron las siguientes condiciones en el termociclador:

1.	Desnaturalización inicial	98°C.	2 min.	} 28 ciclos
2.	Desnaturalización	98°C.	10 seg.	
3.	Desnaturalización	48 °C.	15 seg.	
4.	Desnaturalización	72 °C.	12 seg.	
5.	Extensión	72 °C.	5 min.	
6.	Hold	4 °C.	59 min. + 10 minutos.	

3.2.4.4 Electroforesis para comprobar amplificación del gen 16S.

Para comprobar la amplificación del producto de PCR se preparó 40 mL de gel de agarosa al 1% en buffer TAE tx y se siguieron los mismos pasos mencionados en la electroforesis anterior, y los pozos se cargaron de la siguiente manera:

Carga de pozos	P1
	P2 3 µL de ladder.
	P3 5 µL de BAL 1 + 1 µL de Dye.
	P4 5 µL de BAL 2 + 1 µL de Dye.
	P5 5 µL de BAL 3 + 1 µL de Dye.
	P6 5 µL de BAL 4 + 1 µL de Dye.
	P7
	P8

3.2.4.5 Purificación del producto de PCR.

La purificación se realizó de acuerdo a las indicaciones del kit (QIAquick PCR & Gel cleanup kit), para lo cual primero se añadió 75 µL de buffer PB a la mezcla de reacción (15 µL de producto PCR). Se colocó la columna en un collection tube y se añadió 90 µL de la muestra, se centrifugó a 17,900 g por 60 segundos y se descartó el efluente.

Después se volvió a centrifugar por 2 min para remover el buffer de lavado, se colocó la columna en un tubo eppendorff de 1.5 mL y se añadió 20 μ L de el elution buffer (EB). Se dejó que la columna reposara 1 minuto y se centrifugó por 60 segundos a 17,900 g y finalmente se obtuvo el producto de PCR purificado.

3.2.4.6 Fluorimetría de ADN.

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de ADN presente en cada muestra, primero se preparó el working solution (2.5 μ L de colorante + 997.5 μ L de Buffer TE). Posteriormente, se colocaron 200 μ L del working solution en tubos de 500 y se almacenaron en oscuridad. A cada tubo se le añadió 1 μ L de producto PCR purificado, se colocaron en el vórtex y se les realizó un spin en la microcentrífuga.

Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se dejaron resposar por 5 minutos en oscuridad. Finalmente, se fueron colocando uno a uno los tubos en el fluorímetro y para poder mandar a secuenciar las muestras, estas debían tener como mínimo 25 ng/ μ L de ADN.

3.2.5 Prueba fermentación de azúcares.

Para confirmar los tipos de BAL identificadas por el método molecular de PCR, se realizó la prueba de fermentación de azúcares usando como medio base el caldo rojo fenol, ya que este es el indicador de pH más utilizado para demostrar la fermentación de hidratos de carbono porque la mayoría de los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son ácidos orgánicos (MacFaddin, 2004).

Además, la prueba de fermentación de carbohidratos se realiza cuando se descubren nuevas BAL con la finalidad de determinar cuáles son sus capacidades de fermentación e identificar qué sustratos de carbohidratos no son capaces de fermentar (Syed Yaacob et al., 2018). En esta investigación se evaluó la fermentación de D-manitol, D-xilosa, glucosa, inulina y glicerol.

Para esto primero se preparó el medio caldo rojo fenol de la siguiente forma (pH 7.4 ± 0.2): 10 gramos de peptona caseína, 5 gramos de NaCl, 0.018 gramos de rojo fenol y 1000mL de H₂O. Después, a cada tubo se le agregaron 8 mL del medio previamente preparado, 1% m/v de cada uno de los azúcares (D-manitol, D-xilosa, glucosa, inulina y glicerol) y una campana Durham. Los tubos se esterilizaron en el autoclave a 121°C a 15 libras durante 15 minutos.

Una vez que los tubos esterilizados estuvieran fríos, se inocularon con cada una de las BAL (MRS, MRS + glc+ manitol, M17, M17→MRS) y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas. Para esta prueba se prepararon 5 controles (medio rojo fenol+ tipo de azúcar sin BAL) y se realizó por duplicado, preparándose 50 tubos en total. La interpretación de esta prueba fue la siguiente: positivo pH 6.8 (coloración amarilla y/o formación de gas) y negativo pH 7.4 (sin cambio en coloración-color rojo).

3.2.6 Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% con la finalidad de comparar los diferentes tratamientos utilizados frente a las bacterias patógenas de interés alimentario y para comparar el efecto de cada una de las bacterias patógenas en cada uno de los tratamientos, utilizando el programa estadístico Minitab 14 (Minitab Inc, State College, Pa., Estados Unidos).

Capítulo IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) de la miel.

Al realizar la metodología para el aislamiento de las BAL, en la primera incubación a 37°C sí se observó el crecimiento de las BAL en cada uno de los tratamientos en caldo (MRS, MRS + glucosa 1%, MRS + glucosa 1% + manitol 1.2% y MRS+ glucosa 1% + manitol 1.2% + HCl a pH4). Sin embargo, en la segunda incubación a 37°C en cada uno de los tratamiento en agar (MRS, MRS + glucosa 1%, MRS + glucosa 1% + manitol 1.2% y MRS+ glucosa 1% + manitol 1.2% + HCl a pH4, M17) no se observó el crecimiento de las BAL (**Tabla III**), por lo que se decidió disminuir la temperatura de incubación, encontrándose que entre los 30-32°C es la temperatura óptima para el crecimiento de las BAL de la miel.

Esto puede estar relacionado con la temperatura en la que las abejas se encuentran dentro de las colmenas, ya que se ha reportado que la abeja sin aguijón *Trigona denoitti* requiere una temperatura óptima de entre 31 y 32°C para su supervivencia (Ramli et al., 2017), mientras que la especie *Melipona beecheei* requiere temperaturas menores a los 34°C y la especie *Scaptotrigona hellwegeri* necesita temperaturas menores a los 33°C (Macías-Macías et al., 2011). Además, se ha reportado que las abejas sin aguijón se encuentran más activas en climas cálidos que en climas con muy bajas temperaturas (Vit et al., 2012).

En esta investigación, se observó que en el tratamiento 1 (Agar MRS) las colonias eran blancas, brillantes de aspecto cremoso y bien delimitadas, siendo gram positivas y negativas bacilares (**Figura 9**). Con la finalidad de obtener cultivos puros y únicamente gram positivas, las bacterias se sembraron mediante estría cruzada varias veces hasta observar sólo bacterias gram positivas y catalasa negativa, es decir, no se observó burbujeo al momento de colocar la gota de peróxido de hidrógeno (**Figura 10**).

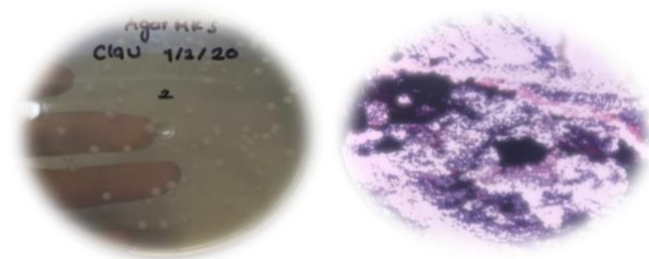


Figura 9. BAL aisladas en el tratamiento 1 (Agar MRS). Al microscopio se observan bacterias gram positivas y gram negativas.

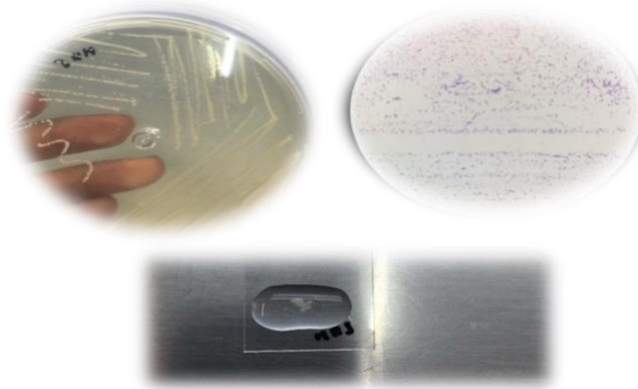


Figura 10. BAL aisladas en tratamiento 1 (Agar MRS) mediante estría cruzada, bacterias gram positivas y catalasa negativa.

Tabla III. Aislamiento y crecimiento de las bacterias ácido lácticas en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)	Temperatura (°C)	Crecimiento de BAL (Caldo MRS)	Tiempo de incubación (h)	Temperatura (°C)	Crecimiento de BAL (Agar MRS)	Crecimiento gram negativas	Temperatura (°C)	Crecimiento de BAL (Agar MRS)	Crecimiento gram negativas
10 g de miel + 90 mL de solución salina al 0.9%	48	37	✗							
10 g de miel + 90mL de caldo MRS (M1)	48	37	✓	48	37	✗				
	48	37	✓	48	32	✓	✓	34 hasta 37	✓	✗
10 g de miel + 90mL de caldo MRS + glucosa 1% (M2)	48	37	✓	48	30-32	✓	✓	34 hasta 37		
10 g de miel + 90mL de caldo MRS + glucosa 1% + manitol 1.2% (M3)	48	37	✓	48	30-32	✓	✗	34 hasta 37	✓	✗
10 g de miel + 90mL de caldo MRS + glucosa 1% + manitol 1.2% + HCl a pH4 (M4)	48	37	✓	48	30-32	✓	✓	34 hasta 37		
10 g de miel + 90mL de caldo MRS (M5)	48	37	✓	48	30-32	AGAR M17 ✓	✗	34 hasta 37	AGAR M17 ✓	✗

✗ Indica que no hubo crecimiento de BAL en el medio.

✓ Indica que si hubo crecimiento de BAL en el medio.

En el tratamiento 2 (Agar MRS + Glucosa 1%), se observaron colonias de color blanquecino, de aspecto cremoso y de menor tamaño que las BAL aisladas en el tratamiento 1, siendo gram positivas y negativas de forma bacilar. Además, mediante la técnica de estría cruzada no se logró aislar únicamente bacterias gram positivas (**Figura 11**). En cambio, en el tratamiento 3 (Agar MRS+ Glucosa 1% + Manitol 1.2%) se aislaron colonias que mostraron aspecto blanquecino brillante, cremosas y bien delimitadas, siendo solo gram positivas de forma bacilar (**Figura 12**) y catalasa negativa (no hubo formación de burbujeo).

Como se mencionó previamente, la adición de glucosa al medio MRS fue para favorecer el crecimiento de las BAL presentes en la miel, ya que se ha reportado que el medio MRS suplementado con fructosa y L-cisteína asemeja las condiciones naturales del ambiente en el que crecen las BAL de la miel debido a que el néctar y el polen son las principales fuentes de alimento para las abejas y estos proveen carbohidratos como glucosa, fructosa y sacarosa, así como minerales, lípidos y proteínas para su óptimo crecimiento. Mientras que el manitol se añadió al medio para evitar el crecimiento de bacterias gram negativas, ya que estas son incapaces de metabolizarlo de forma rápida o en su totalidad (Lamei et al., 2017; Vásquez et al., 2012). En la investigación realizada por Lani et al. (2015) también lograron aislar BAL de la miel utilizando MRS suplementado con glucosa al 1%, encontrándose BAL gram positivas y catalasa negativas. Esto también fue observado por Aween et al. (2012) quien logró aislar diferentes tipos de BAL de diferentes tipos de mieles en MRS suplementado con glucosa al 1%.

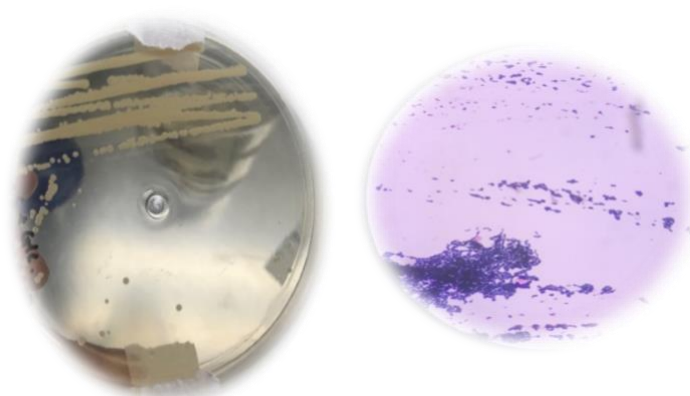


Figura 11. BAL aisladas en tratamiento 2 (Agar MRS+ Glucosa 1%).

Observándose bacterias gram positivas y gram negativas.

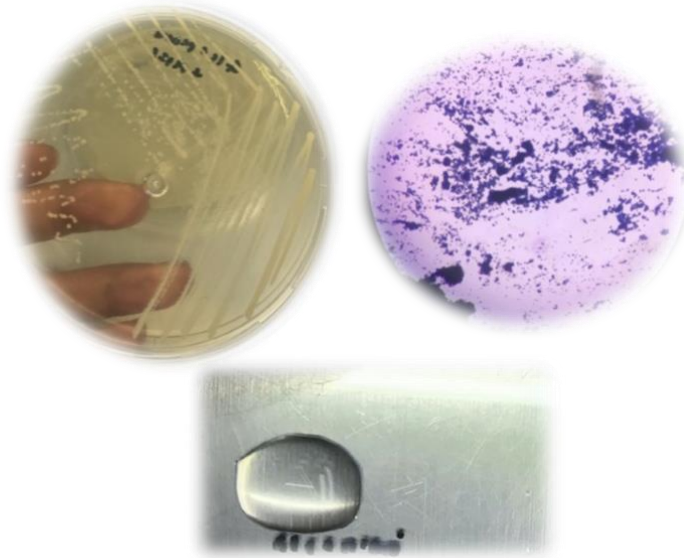


Figura 12. BAL aisladas en el tratamiento 3 (Agar MRS + Glucosa 1% + Manitol 1.2 %), gram positivas y catalasa negativa.

En el tratamiento 4 (Agar MRS+ Glucosa 1% + Manitol 1.2% + HCL a pH4), se aislaron colonias con aspecto blanquecino brillante, cremoso, gram positivos en su mayoría y en forma de cocos (**Figura 13**), mientras que en el tratamiento 5 (Agar M17) se observaron colonias con aspecto blanquecino brillante, cremoso y de menor tamaño comparadas con las BAL del tratamiento 3, gram positivos y catalasa negativas (**Figura 14**). El Agar M17 es un medio útil para el crecimiento de BAL y para la inhibición de bacterias gram negativas debido a que este medio no tiene azúcares simples, como la dextrosa que se encuentra en la composición del MRS, ya que estos azúcares simples son fácilmente metabolizados por casi todas las bacterias y levaduras (Da Silva et al., 2013; Hayek et al., 2019). Lani et al. (2015) también logro aislar BAL de la miel producida por *Heterotrigona itama* utilizando agar M17, observando bacterias gram positivas en forma de bastones y catalasa negativas.



Figura 13. BAL aisladas en el tratamiento 4 (Agar MRS+ Glucosa 1% + Manitol 1.2%+ HCl pH 4). En su mayoría gram positivos.

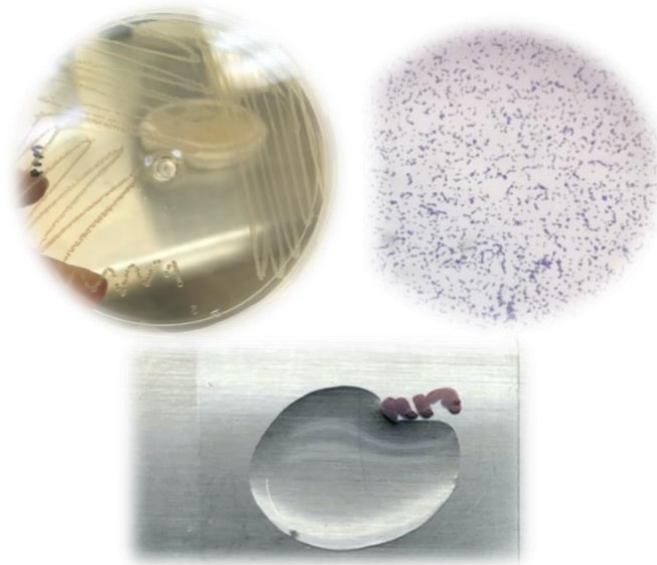


Figura 14. BAL aisladas en el tratamiento 5 (Agar M17). Gram positivas y catalasa negativa.

4.2 Actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos frente a bacterias patógenas mediante el ensayo de difusión de discos.

En el ensayo de difusión de discos con las BAL aisladas en los diferentes tratamientos (MRS, MRS + Glucosa 1% + Manitol 1.2%, M17 y M17→MRS) se encontró que las BAL aisladas en el tratamiento con MRS y M17→MRS (**Tabla IV**) mostraron actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas (*S. typhimurium*, *E. coli* y *S. flexneri*) y frente las bacterias gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*).

Estos resultados concuerdan con lo observado por Syed Yaacob et al. (2018), quienes encontraron que las BAL aisladas (*Lactobacillus sp.* y *Fructobacillus fructosus*) de la miel de abeja, *Heterotrigona itama*, fueron capaces de inhibir tanto a bacterias gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*) como a gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*), observándose halos de inhibición de 16.5-27.3 mm, siendo la BAL *Fructobacillus fructosus* la que fue más efectiva en inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*. También, Lani et al. (2015) observaron que las BAL (*Levilactobacillus brevis* y *Lactobacillus sp.*) aisladas en la miel de abeja melipona de Malasia tenían la capacidad de inhibir a las bacterias gram positivas *S. epidermidis* (halo de inhibición de 25-32 mm) y *L. monocytogenes* (14-18mm) y a la bacteria gram negativa *P. aeruginosa* (halo de inhibición 13-15 mm).

Incluso, esto se relaciona con lo observado por Shah et al. (2019) quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de 50 mieles provenientes de diferentes regiones de Pakistán (Dir, Swat y Oghi) frente a bacterias gram positivas y gram negativas mediante el ensayo de difusión en disco, observándose que las mieles de las diferentes regiones presentaron diferentes zonas de inhibición frente las bacterias patógenas, encontrándose halos de inhibición de 17-23 mm frente a *E. coli*, de 31.37 mm frente a *S. typhimurium*, de 28 mm frente a *E. faecalis*, de 14-15 mm frente a *P. aeruginosa*, de 20-24 mm frente a *K. pneumoniae* y de 19-25 mm frente a *S. aureus*. También, se observó que la miel de Oghi fue la que presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a estas bacterias patógenas. Sin embargo, Kimoto-Nira & Amano (2008) observaron que las mieles producidas por las abejas sin aguijón *Scaptotrigona bipunctata* (Asunción, Paraguay), *Trigona carbonaria* (Gatton, Australia) y *Trigona pagdeni* (Chantaburi, Tailandia) no fueron capaces de inhibir a las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus* sp.

Tabla IV. Actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos frente a bacterias patógenas mediante el ensayo de difusión de discos*.

	MRS	MRS+GLU+MAN	M17	M17-MRS
<i>S. typhimurium</i>	11.295±0.403 ^{aA}	12.580±0.410 ^{aA}	11.82±1.62 ^{aA}	12.050±0.693 ^{aA}
<i>E. coli</i>	10.220±1.400 ^{aA}	12.63±0.00 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	10.130±1.840 ^{aA}
<i>S. aureus</i>	10.730±0.396 ^{aA}	9.110±1.103 ^{bA}	9.995±0.601 ^{aA}	10.320±0.014 ^{aA}
<i>E. faecalis</i>	10.400±0.580 ^{aA}	10.920±0.014 ^{abA}	10.465±0.445 ^{aA}	10.385±0.488 ^{aA}
<i>S. flexneri</i>	10.135±1.039 ^{aA}	11.810±0.919 ^{aA}	13.070±0.665 ^{aA}	11.950±2.450 ^{aA}

*El diámetro de inhibición en mm.

^aLas medias que comparten letra en la misma columna, no muestran diferencia significativa (p<0.05).

^ALas medias que comparten letra en la misma fila, no muestran diferencia significativa (p<0.05).

Además, se encontró que las BAL aisladas del tratamiento con MRS+ Glucosa 1% + Manitol al 1.2% (**Tabla IV**) presentaron una mayor actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas que frente a las gram positivas, lo cual también fue observado en el estudio realizado por Ávila et al. (2019) que encontraron que la miel de abeja sin aguijón de las especies *Melipona* y *Scaptotrigona* en Brasil tenían una mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. typhimurium* que frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. En cambio, Aween et al. (2012) observaron que las BAL aisladas de diferentes mieles provenientes de Camerún, Malasia, Libia, Arabia Saudita y Nueva Zelanda mostraron una mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas, como *S. aureus* multirresistente a antibióticos (MRA), *S. epidermidis* y *B. subtilis*. Además, encontraron que la especie *L. acidophilus*, aislada de la miel de manuka producida en Nueva Zelanda mostró mayor inhibición frente a *S. aureus* MRA (25 mm), seguido de la especie de *L. acidophilus* aislada de la miel producida en Arabia Saudita.

Es importante señalar que en la presente investigación las BAL aisladas en el tratamiento con M17 (**Tabla IV**), mostraron efecto frente a las bacterias gram positivas y gram negativas a excepción de *E. coli*, que no fue capaz de ser inhibida. Este efecto también fue observado por Lani et al. (2015), quienes encontraron que las BAL (*Levilactobacillus brevis* y *Lactobacillus sp*) aisladas en la miel de abeja melipona de Malasia fueron incapaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. Typhimurium*. En cambio en la investigación realizada por Hasali et al. (2018), encontraron que tres tipos de mieles producidas por la abeja sin aguijón, *Heterotrigona itama*, fueron capaces de inhibir a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* y *E. coli*, siendo esta última la bacteria más sensible mostrando halos de inhibición de 26.5 a 32.8 mm.

De la **Figura 15** a la **Figura 19**, se puede observar el halo de inhibición mostrado por cada una de las BAL en los diferentes tratamientos frente a las diferentes bacterias patógenas, observándose que en los controles no hay halo de inhibición.

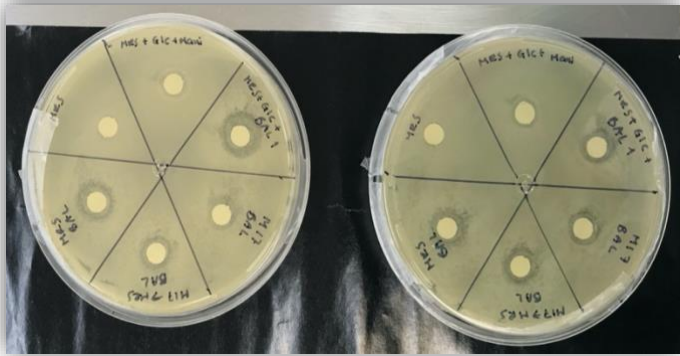


Figura 15. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a *Salmonella Typhimurium*.

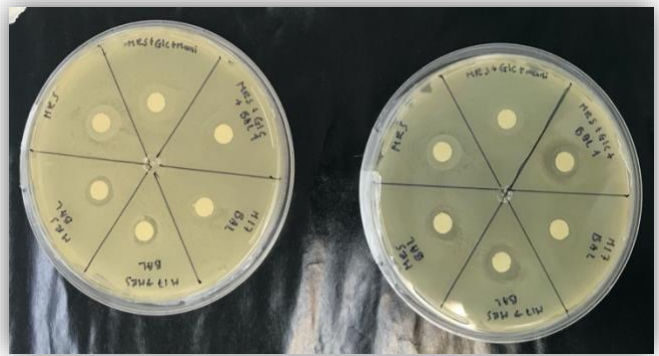


Figura 16. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a *Escherichia coli*.

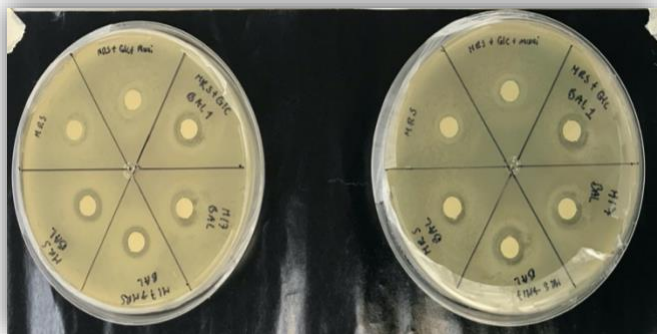


Figura 17. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a *Staphylococcus aureus*.

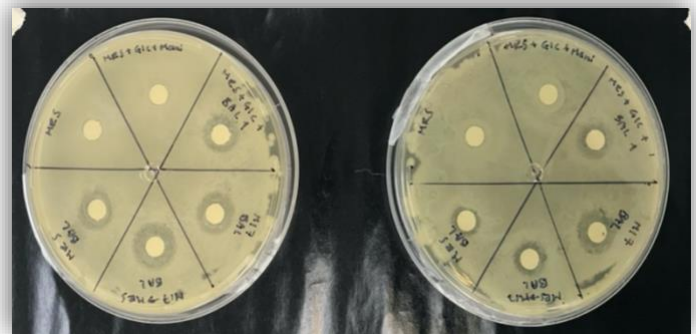


Figura 18. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a *Shigella flexneri*.

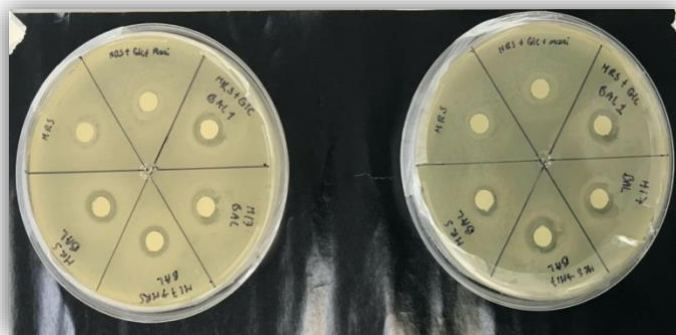


Figura 19. Actividad antimicrobiana de las BAL frente a *Enterococcus faecalis*.

4.3 Actividad antimicrobiana del sobrenadante usando microplacas.

Al realizar la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cada una de las BAL aisladas en los diferentes tratamientos (MRS, MRS + glc 1% + mani 1.2%, M17 y M17-MRS) a diferentes diluciones (D1-D3) frente a las bacterias gram negativas y gram positivas, se observó que la dilución 1 (D1) fue la que presentó mayor actividad antimicrobiana, al disminuir casi por completo la densidad óptica, comparado con el grupo control, mientras que la dilución 2 (D2) y la dilución 3 (D3) no fueron capaces de inhibir a las bacterias gram negativas y gram positivas (**Tabla V**).

Tabla V. Efecto del sobrenadante de las BAL frente a bacterias gram negativas y gram positivas *.

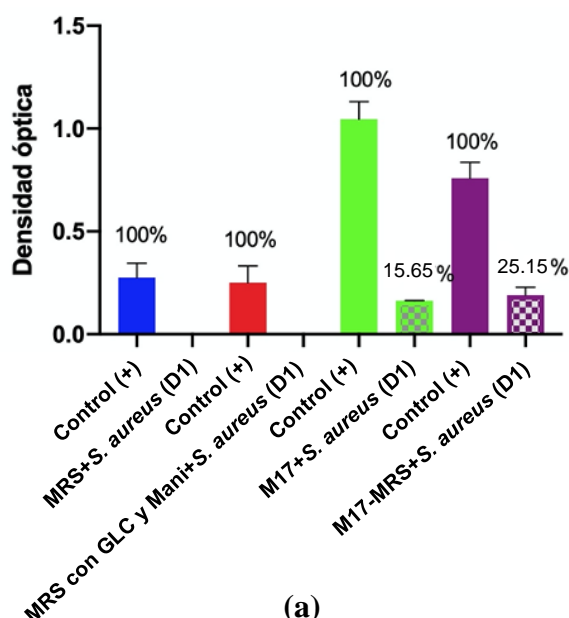
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
MRS	Control	1.229±0.043 ^a	1.079±0.030 ^b	0.934±0.085 ^b	0.276±0.069 ^b	1.312±0.086 ^a
	D1	0.017±0.003 ^b	0.213±0.002 ^c	0.130±0.004 ^c	0.000 ^c	1.074±0.035 ^b
	D2	1.278±0.014 ^a	1.312±0.070 ^a	1.148±0.011 ^a	0.462±0.021 ^a	1.364±0.041 ^a
	D3	1.364±0.113 ^a	1.116±0.029 ^b	1.142±0.013 ^a	0.396±0.005 ^a	1.136±0.026 ^b
MRS + Glc 1%+ Manitol 1.2 %	Control	1.144±0.048 ^a	0.621±0.117 ^a	0.769±0.058 ^b	0.251±0.082 ^b	0.949±0.098 ^a
	D1	0.000 ^b	0.056±0.018 ^c	0.000 ^c	0.000 ^c	0.000 ^b
	D2	0.671±0.023 ^c	0.709±0.041 ^a	0.858±0.040 ^{ab}	0.452±0.078 ^a	1.003±0.147 ^a
M17	D3	0.879±0.022 ^d	0.350±0.028 ^b	0.862±0.010 ^a	0.486±0.076 ^a	0.819±0.066 ^a
	Control	1.073±0.060 ^a	1.045±0.024 ^b	1.063±0.031 ^a	1.046±0.085 ^a	1.353±0.118 ^a
	D1	0.024±0.006 ^b	0.206±0.004 ^c	0.131±0.007 ^b	0.164±0.001 ^b	0.153±0.002 ^b
	D2	1.264±0.012 ^a	1.215±0.109 ^a	1.078±0.034 ^a	1.100±0.132 ^a	1.343±0.124 ^a
M17→ MRS	D3	1.222±0.174 ^a	1.039±0.037 ^b	1.134±0.034 ^a	0.971±0.146 ^a	1.420±0.006 ^a
	Control	0.299±0.005 ^a	0.461±0.126 ^a	0.243±0.069 ^b	0.758±0.077 ^a	0.290±0.069 ^c
	D1	0.000 ^c	0.161±0.003 ^b	0.000 ^c	0.191±0.037 ^b	0.000 ^d
	D2	0.231±0.010 ^b	0.281±0.046 ^{ab}	0.563±0.081 ^a	0.248±0.011 ^b	0.401±0.032 ^b
	D3	0.307±0.034 ^a	0.373±0.054 ^a	0.299±0.006 ^b	0.630±0.135 ^a	0.545±0.016 ^a

*Resultados en densidad óptica

^aLas medias que comparten letra en la misma fila de cada tratamiento, no muestran diferencia significativa (p<0.05).

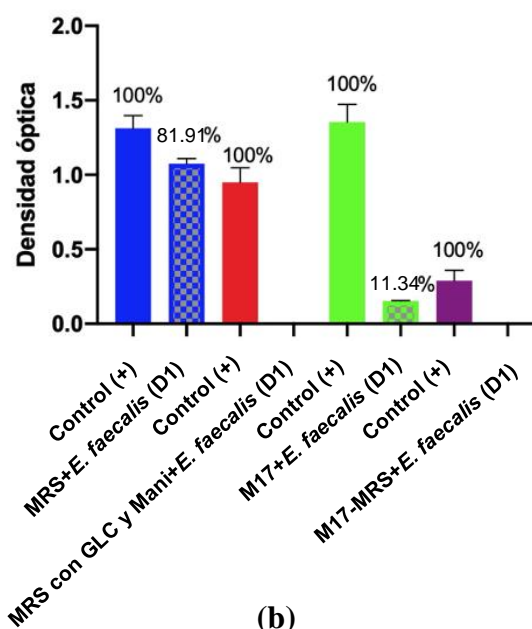
En relación al efecto del sobrenadante de las BAL aisladas en los diferentes tratamientos (D1) frente a las bacterias gram positivas, *S. aureus* y *E. faecalis* (**Figura 20**), se observó que el sobrenadante de las BAL aisladas el tratamiento con MRS y MRS+ glc 1% + mani 1.2% fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en su totalidad y el sobrenadante de las BAL aisladas en los tratamiento con M17 y M17-MRS fueron capaces de inhibir el crecimiento de esta bacteria gram positiva en un 84.35% y en un 74.85% respectivamente (**Figura 20 a**). Sin embargo, el sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento con MRS fue incapaz de inhibir el crecimiento de *E. faecalis* aunque el sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento con MRS+ glc 1% + mani 1.2% y M17-MRS fue capaz de inhibir completamente el crecimiento de *E. faecalis* (**Figura 20 b**).

Efecto de los tratamientos frente a *S. aureus*



(a)

Efecto de los tratamientos frente a *E. faecalis*



(b)

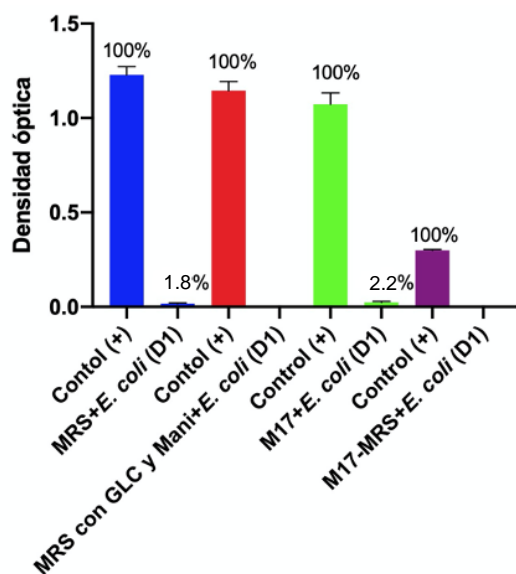
*El % indica el crecimiento de cada uno de los patógenos.

Figura 20. Efecto de los diferentes tratamientos (D1) frente a las bacterias gram positivas.

Al evaluar el efecto del sobrenadante de las BAL aisladas en los diferentes tratamientos con la dilución 1, se encontró que estas son capaces de inhibir casi en su totalidad a las bacterias gram negativas, *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. flexneri* (**Figura 21**). El sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento con MRS+ glc 1% + mani 1.2% y en el tratamiento con M17-MRS fueron capaces de inhibir en su totalidad a *E. coli* (**Figura 21 a**), mientras que el sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento con MRS logró inhibirla en un 98.2% y en el tratamiento con M17 en un 97.8%.

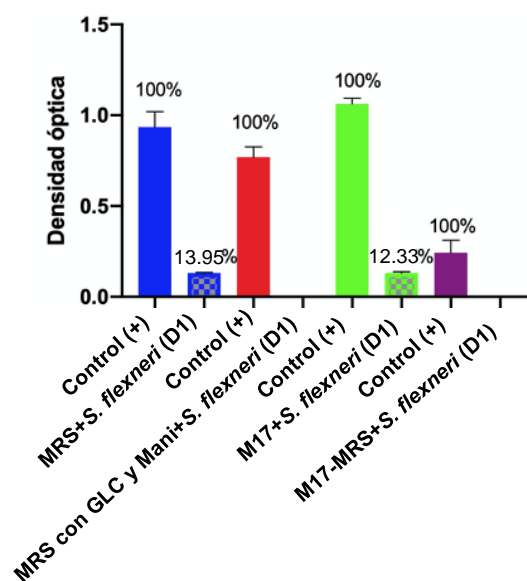
También se observó que el sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento MRS+ glc 1% + mani 1.2% y en el tratamiento con M17-MRS las BAL fueron capaces de inhibir por completo a *S. flexneri* (**Figura 21 b**). Además, las BAL en el tratamiento con MRS+ glc 1% + mani 1.2% presentó mayor inhibición (90.92%) frente a *S. thyphimurium* comparado con los otros tratamientos (**Figura 21 c**).

Efecto de los tratamientos frente a *E. coli*



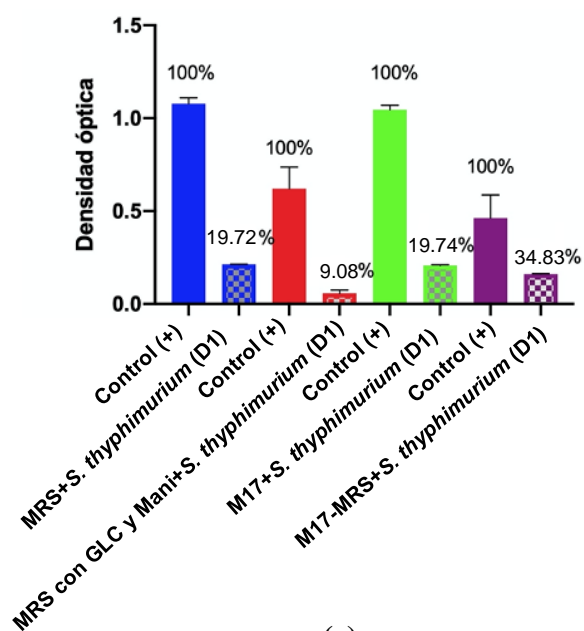
(a)

Efecto de los tratamientos frente a *S. flexneri*



(b)

Efecto de los tratamientos frente a *S. thyphimurium*



(c)

*El % indica el crecimiento de cada uno de los patógenos.

Figura 21. Efecto de los diferentes tratamientos (D1) frente a las bacterias gram negativas.

A partir de los resultados anteriores, se puede observar que el sobrenadante de las BAL aisladas en diferentes tratamientos tienen la capacidad de inhibir en mayor o menor proporción a las bacterias patógenas evaluadas. Esto también fue observado por Aween et al. (2012), quienes evaluaron el efecto antimicrobiano del sobrenadante de las BAL aisladas de diferentes mieles observándose que todas las BAL aisladas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis* MRA entre un 40-80% después de 24 horas de incubación comparado con el grupo control. Además, observaron que la BAL aislada de la miel de Arabia Saudita fue la única en inhibir por completo el crecimiento de *S. aureus*, la miel de Camerún en inhibir en su totalidad a *S. epidermidis* y la miel de Nueva Zelanda fue la única en inhibir por completo el crecimiento de *S. epidermidis* y *B. subtilis*. Es importante señalar que las BAL identificadas en la miel de Arabia Saudita y Nueva Zelanda pertenecieron a la especie *L. acidophilus*, sin embargo, cada una tuvo efecto diferente sobre las bacterias patógenas evaluadas.

La inhibición en el crecimiento tanto de bacterias positivas como negativas, también fue observado por Sgariglia et al. (2010), quienes encontraron que la miel producida por *T. angustula* era capaz de inhibir a bacterias gram positivas como *S. aureus* y *E. faecalis* y a bacterias gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, Chanchao (2009) encontró que la miel de abeja producida por *T. laeviceps* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*.

Es importante mencionar que, en esta investigación, el sobrenadante de las BAL aisladas en el tratamiento con MRS+ glc 1% + mani 1.2% fue el más efectivo en inhibir en su totalidad el crecimiento de las bacterias gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y gram negativas (*E. coli* y *S. flexneri*) y en un 90.92% a la bacteria gram negativa *S. thyphimurium*. Esto pudiera estar relacionado a que este medio al estar enriquecido con glucosa pudiera asemejar más las condiciones naturales de la miel y favorecer un mejor crecimiento y una mayor producción de metabolitos de las BAL presentes en la miel (Lamei et al., 2017; Vásquez et al., 2012).

4.4 Identificación de BAL mediante PCR.

Para realizar el método molecular de PCR, primero se realizó la extracción del ADN de las BAL y se hizo una electroforesis para comprobar la extracción del ADN, observándose en el transiluminador el gel con el ADN de las BAL aisladas en los cuatro tratamientos al verse todas las bandas marcadas (**Figura 22**).

Después de realizar la amplificación del gen 16S se realizó otra electroforesis para comprobar la amplificación, observándose en el transiluminador el gel con una banda marcada a las 1500pb en cada una de las BAL aisladas en los cuatro tratamientos (**Figura 23**).

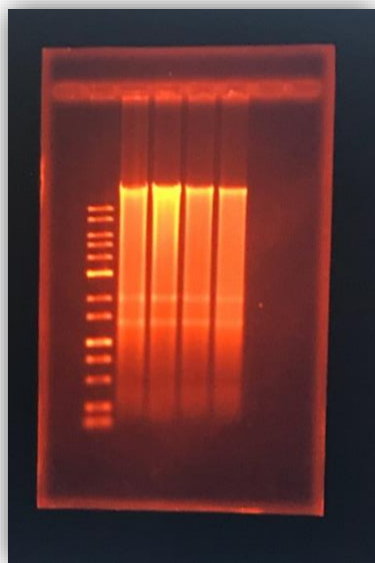


Figura 22. ADN de las cuatro BAL, al verse todas las bandas marcadas.

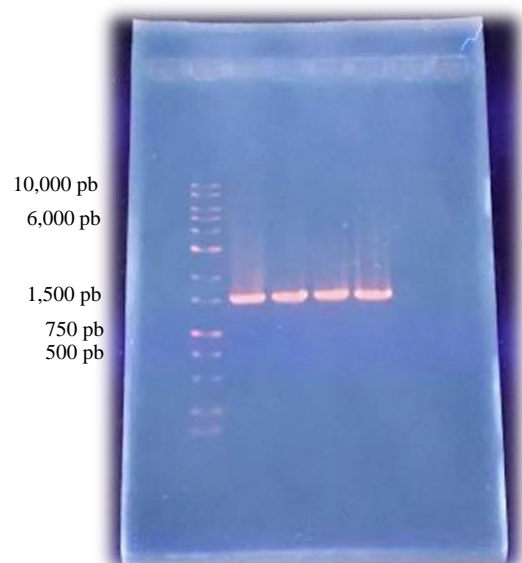


Figura 23. Amplificación del gen 16 S de las cuatro BAL, al verse una banda marcada a 1500pb.

Posteriormente, se cuantificó mediante fluorimetría la cantidad de ADN presente en cada una de las muestras para mandar a secuenciarlas, obteniéndose concentraciones mayores a los 121 ng/μL (**Tabla VI**).

Tabla VI. Concentración de ADN presente en cada una de las muestras.

Tipo de BAL	Concentración de ADN
Muestra 1 (MRS)	121 ng/μL
Muestra 2 (MRS+ glc 1% + mani 1.2%)	145 ng/μL
Muestra 3 (M17)	134 ng/μL
Muestra 4 (M17→ MRS)	127 ng/μL

Una vez obtenidas las secuencias, estas se analizaron y corrigieron mediante el programa Bioedit, en el cual se alinearon las secuencias de cada una de las muestras por triplicado con la finalidad de corregir errores que se originaran al azar y así poder deducir la secuencia más próxima a la correcta (**Figura 24 a-d**). Una vez obtenida la secuencia correcta, se utilizó el programa BLAST

para comparar la secuencia de interés con las secuencias disponibles en la base de datos (**Figura 25**), encontrándose que en los diferentes tratamientos se encontraba presente solo un tipo de BAL, la cual coincidió con la especie *Lactiplantibacillus plantarum* o con la especie *Lactiplantibacillus pentosus* (**Tabla VII**).

Tabla VII. Análisis del alineamiento de secuencias obtenidas mediante la amplificación del gen 16S.

Sample	Most closely related type strain	Query Cover	Per. Ident	Accession number
MRS (MR)	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain DSM 20314	99%	100%	CP032757.1
MRS (MR)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain DSM 20174	99%	100%	CP039121.1
MRS+ glc 1 % + mani 1.2% (MG)	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain DSM 20314	99%	99.65%	CP032757.1
MRS+ glc 1 % + mani 1.2% (MG)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain DSM 20174	99%	99.65%	CP039121.1
M17 (MD)	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain DSM 20314	99%	99.57%	CP032757.1
M17 (MD)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain DSM 20174	99%	99.57%	CP039121.1
M17→ MRS (RD)	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain DSM 20314	99%	99.57%	CP032757.1
M17→ MRS (RD)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain DSM 20174	99%	99.57%	CP039121.1

Secuencia corregida de la BAL aislada en el tratamiento

```
>MRcorrectedsequence73
GCAGCTATACATGCAAGTCGACGAACCTGGTATTGATTGGTGCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAG
TGCGAACTGGTGGTAAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTA
ATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCC
CGCGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATTGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGT
AATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAAT
GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAA
AGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGTAACTAGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC
GGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGT
GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGT
```

(a)

Secuencia corregida de la BAL aislada en el tratamiento con M17 (MD).

```
>MDcorrectedsequence79
ATGCAAGTCGACGAACCTGGTATTGATTGGTGCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTG
GTGAGTAAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA
ACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGCGTAT
TAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATTGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGAGCAAG
TCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAAT
ATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
GACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAAG
```

(c)

Secuencia corregida de la BAL aislada en el tratamiento con

MRS + glc 1% + mani 1.2% (MG).

```
>MGcorrectedsequence74
ATGCAAGTCGACGAACCTGGTATTGATTGGTGCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTG
GTGAGTAAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA
ACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGCGTAT
TAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATTGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGAGCAAG
TCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAAT
ATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAG
GACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGCGCGCT
GTCTGCTGTAACGTAGCGTGGCTCGAAAGTATGGGATAGCAACAGGATAGATACCTGTTAGTATCCCA
TACCGTAAACGATGAATGTTGGAGGGCTTCGCCCTTCAGTGTGCAGTAAACGATTAAGCATT
CCGCTGGGGGA
```

(b)

Secuencia corregida de la BAL aislada en el tratamiento con M17→ MRS (RD).

```
>Rdcorrectedsequence82
CTATACATGCAAGTCGACGAACCTGGTATTGATTGGTGCTGCATCATGATTACATTTGAGTGAGTGGC
GAACTGGTGGTAAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTAATAC
CGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCG
GCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATTGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATC
GGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGA
CGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGA
AGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAACTAGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTAA
TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGC
GAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGG--
```

(d)

Figura 24. Secuencias corregidas obtenidas de cada una de las BAL aisladas en los diferentes tratamientos.

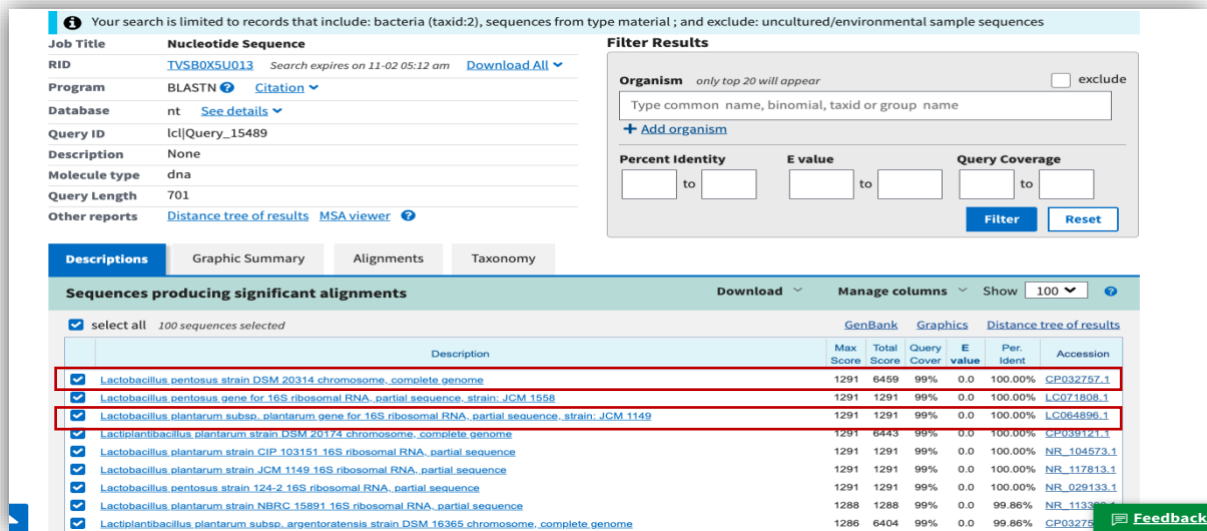


Figura 25. Especies de BAL con mayor homología con respecto a la secuencia de interés aislada en el tratamiento con M17.

Diversos estudios han reportado el aislamiento de BAL del estómago de las abejas, de flores y plantas, sugiriendo que las BAL presentes en la miel probablemente provengan de las plantas de las cuales se alimentan las abejas y de las BAL presentes en el intestino de las abejas (Lusby et al., 2002). En la investigación realizada en la miel de abeja melipona de la región de Malasia, se lograron aislar cinco BAL, al realizar la amplificación del gen 16S, estas BAL pertenecieron a las especies de *Levilactobacillus brevis* y a la especie de *Lactobacillus sp.* (Lani et al., 2015).

Mientras que Syed Yaacob et al. (2018) también identificaron la presencia de *Lactobacillus sp.* en una de las BAL aisladas en la miel producida por la abeja sin aguijón *Heterotrigona itama* y a su vez, lograron aislar otras tres BAL, las cuales pertenecieron a la especie *Fructobacillus fructosus*. En cambio, Aween et al., (2012) lograron aislar 32 BAL de trece tipos de mieles producidas en diferentes partes del mundo, únicamente se seleccionaron seis de estas BAL de las mieles de Libia, Arabia Saudita y Nueva Zelanda para su identificación, las cuales pertenecieron a la especie de *L. acidophilus*.

Se ha reportado la presencia de *Fructobacillus fructosus* en el intestino de la abeja *Apis spp.* de Kenia, Tailandia y México (Carina Audisio et al., 2011). Además, en las abejas con aguijón también se han identificado las especies de *Lactobacillus spp.* y *Lactobacillus kunkeei* en la miel producida por la abeja *Apis dorsata* en la región de Malasia (Tajabadi et al., 2013). Mientras que en la miel producida por la abeja *Apis mellifera meda* de Irán, se lograron aislar BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Enterococcus*; la especie de *Lactobacillus* más abundante fue *L. plantarum* seguido de la especie *L. pentosus* (Feizabadi et al., 2021). Estos resultados son similares a lo observado por

Tajabadi, Mardan, Saari, et al. (2013) quienes lograron identificar la especie *L. plantarum* en el estómago y en las colmenas de las abeja *Apis dorsata* de Asia.

4.5 Prueba fermentación de azúcares.

Debido a que la BAL aislada en los diferentes tratamientos podía pertenecer tanto a la especie *Lactiplantibacillus plantarum* o a la especie *Lactiplantibacillus pentosus*, se realizó la prueba de fermentación de azúcares, encontrándose que la BAL aislada en los diferentes tratamientos fue negativa a la fermentación del glicerol y de la D-xilosa (**Figura 26** y **Figura 27**) ya que no se observó cambio en la coloración, ni hubo formación de gas, mientras que fue positiva a la fermentación de glucosa, inulina y D-manitol (**Figura 28-30**) debido a que hubo un cambio en el color de rojo a amarillo, pero no se observó la formación de gas (**Tabla VIII**). Se ha reportado que *L. pentosus* es positivo a la fermentación de glicerol y D-xilosa, por esta razón la BAL aislada en los diferentes tratamientos pertenece a la especie de *L. plantarum* ya que esta es negativa a la fermentación de glicerol y D-xilosa (Zanon et al., 1987; I. Sánchez et al., 2000).

Tabla VIII. Prueba de fermentación de azúcares de la BAL aislada en los diferentes tratamientos.

	MRS	MRS + glc 1% + mani 1.2%	M17	M17→ MRS
D-Manitol	+	+	+	+
Producción gas	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	-
Producción gas	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+
Producción de gas	-	-	-	-
Inulina	+	+	+	+
Producción de gas	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-
Producción de gas	-	-	-	-

Interpretación: Positivo →Color amarillo y/o producción de gas.

Negativo→ Color rojo.

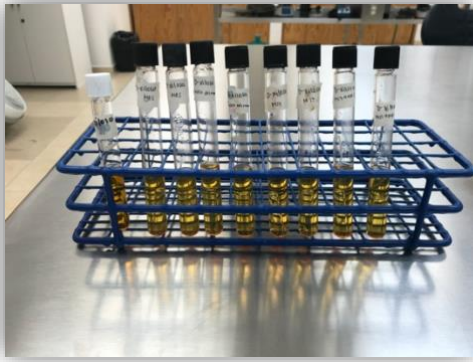


Figura 26. Fermentación del glicerol
(negativo).

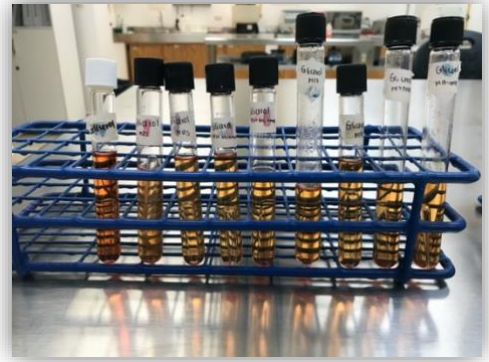


Figura 27. Fermentación de D-xilosa
(negativo).

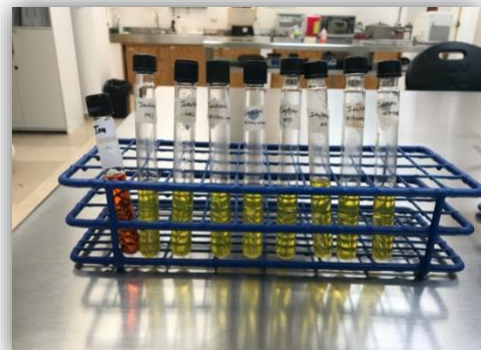


Figura 28. Fermentación de inulina
(positivo).

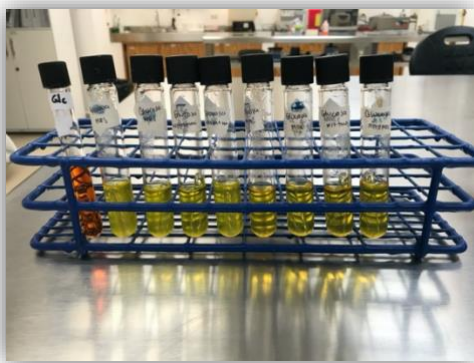


Figura 29. Fermentación de glucosa
(positivo).

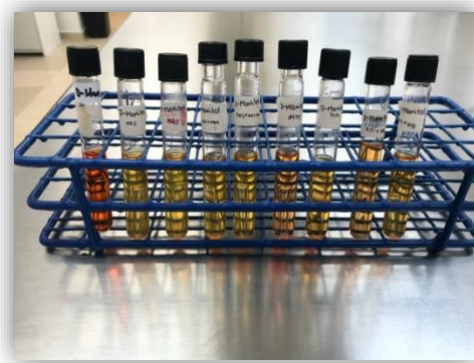


Figura 30. Fermentación de D-manitol
(positivo).

El uso de los probióticos y su investigación ha incrementado en los últimos años debido a que estos contienen microorganismos que en cantidades adecuadas benefician la salud de la persona que los consume. Entre estos beneficios se encuentran la prevención y el tratamiento de enfermedades como dislipidemias, diabetes, obesidad, enfermedad inflamatoria intestinal e incluso alergias. Debido a que los probióticos ayudan a evitar la disbiosis en la microbiota presente en estas enfermedades, a inhibir la producción de citocinas inflamatorias mediante la estimulación del sistema inmune en procesos alérgicos, a disminuir la acumulación de grasa en las dislipidemias y obesidad y a tener efectos hipoglucemiantes en la diabetes.

Los probióticos se caracterizan principalmente por la presencia de BAL, las cuales tienen una gran importancia en la industria alimenticia, en la agricultura y en la industria farmacéutica. Las BAL, se encuentran principalmente en alimentos fermentados como el yogurt, el queso, el vino, chucrut y aceitunas e incluso recientemente se ha reportado su presencia en la miel. La miel de abeja sin aguijón tiene una alta actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de azúcar, acidez, peróxido de hidrógeno, compuestos fitoquímicos y así como por la presencia de BAL debido a que estas producen metabolitos como ácidos orgánicos y bacteriocinas.

A partir de este estudio se analizó la actividad antimicrobiana de la BAL presente en la miel de abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, mediante el ensayo de difusión en disco y el efecto del sobrenadante de la BAL en diferentes tratamientos frente a las bacterias gram negativas *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. flexneri* y frente a las bacterias gram positivas *S. aureus* y *E. faecalis*, encontrándose que la BAL de la miel presentó mayor efecto antimicrobiano frente a las bacterias gram negativas.

Entre los hallazgos más importantes durante esta investigación fueron que el enriquecimiento del caldo MRS y Agar MRS con glucosa y manitol favorece el crecimiento de la BAL de la miel de abeja sin aguijón (*Scaptotrigona mexicana*), la cual puede utilizarse en la formulación de alimentos probióticos fermentados. Además, se observó que en el ensayo de difusión en disco *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. flexneri* son capaces de ser inhibidas por la BAL presente en todos los tratamientos, pero *E. coli* no pudo ser inhibida por el tratamiento con agar M17. Esto pudiera deberse a que este medio carece de azúcares simples, por lo que esto no favoreció el crecimiento óptimo de la BAL presente en la miel como lo hicieron los tratamientos con MRS y MRS + glc + manitol, ya que el medio MRS en su composición contiene azúcares simples mientras que el otro medio fue adicionado con glucosa, lo cual asemejó las condiciones naturales de la miel y esto favoreció a un crecimiento

óptimo de la BAL presentando una mejor actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas evaluadas.

Con respecto al efecto del sobrenadante de la BAL presente en la miel de abeja sin aguijón, *Scaptotrigona mexicana*, se observó que el filtrado de BAL en MRS+ glc+ manitol es el tratamiento más efectivo ya que mostró mayor inhibición frente a bacterias gram positivas y gram negativas. Además, el filtrado de BAL en todos los tratamientos tuvo mayor inhibición frente a *E.coli*, lo cual es importante de resaltar ya que otros tipos de mieles y BAL aisladas en otras mieles no han presentado efecto frente esta bacteria gram negativa, la cual en los últimos años está siendo objeto de estudio debido a su alta resistencia antimicrobiana.

Finalmente, en relación a la identificación de la BAL mediante el método molecular de PCR del gen 16S, la BAL presente en la miel de abeja producida por *Scaptotrigona mexicana* es más similar a *Lactiplantibacillus plantarum* cepa DSM 20174 y a través de la prueba de fermentación de azúcares, se encontró que esta BAL es capaz de fermentar la inulina por lo que puede ser utilizada en la formulación de un alimento simbiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, N., Zepeda, R., Vázquez, D. M., & Aldaroso, M. M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies*. México: El Colegio de la Frontera Sur : Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Ayala, R., González, V., & Engel, M. (2012). *Pot-Honey A legacy of stingless bees*, capítulo 9. Estados Unidos: Springer.
- a, H. S., & a, I. S. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013(November), 73–87. http://file.scirp.org/Html/10-2700895_40133.htm
- Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless bee honey, the natural wound healer: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30(2), 66–75. <https://doi.org/10.1159/000458416>
- Abdullah, I., Gary, S. R., & Marla, S. (2007). Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38, 67–76. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Admassie, M. (2018). A Review on Food Fermentation and the Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. *World Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 19. <https://doi.org/10.11648/j.wjfst.20180201.13>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Díaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2490–2499. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.021>
- Amiriani, T., Rajabli, N., Faghani, M., Besharat, S., Roshandel, G., Tabib, A. A., & Joshaghani, H. (2020). Effect of lactocare® synbiotic on disease severity in ulcerative colitis: A randomized placebo-controlled double-blind clinical trial. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 12(1), 271–277. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2020.160>
- An, S. Y., Lee, M. S., Jeon, J. Y., Ha, E. S., Kim, T. H., Yoon, J. Y., Ok, C. O., Lee, H. K., Hwang, W. S., Choe, S. J., Han, S. J., Kim, H. J., Kim, D. J., & Lee, K. W. (2013). Beneficial effects of fresh and fermented kimchi in prediabetic individuals. *Annals of Nutrition and Metabolism*,

- 63(1–2), 111–119. <https://doi.org/10.1159/000353583>
- Arnold, N., Zepeda, R., Vázquez, D. M., & Aldaroso, M. M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies*.
- Asemi, Z., Zare, Z., Shakeri, H., Sabihi, S. S., & Esmailzadeh, A. (2013). Effect of multispecies probiotic supplements on metabolic profiles, hs-CRP, and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1159/000349922>
- Ataie-Jafari, A., Larijani, B., Alavi Majd, H., & Tahbaz, F. (2009). Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 54(1), 22–27. <https://doi.org/10.1159/000203284>
- Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiasi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science and Technology*, 81(August), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.002>
- Ávila, S., Hornung, P. S., Teixeira, G. L., Malunga, L. N., Apea-Bah, F. B., Beux, M. R., Beta, T., & Ribani, R. H. (2019). Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. *Food Research International*, 123(November 2018), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.068>
- Aween, M. M., Hassan, Z., Muhialdin, B. J., Eljamel, Y. A., Al-Mabrok, A. S. W., & Lani, M. N. (2012). Antibacterial Activity of *Lactobacillus acidophilus* Strains Isolated from Honey Marketed in Malaysia against Selected Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Gram-Positive Bacteria. *Journal of Food Science*, 77(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02776.x>
- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 979–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
- Baek, Y., Kim, Y. J., Baik, M. Y., Kim, D. O., & Lee, H. (2015). Total phenolic contents and antioxidant activities of Korean domestic honey from different floral sources. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1453–1457. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0187-8>
- Bartkiene, E., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Krungleviciute, V., Mayrhofer, S., & Domig, K. (2017). The contribution of *P. acidilactici*, *L. plantarum*, and *L. curvatus* starters and L-(+)-lactic acid to

- the acrylamide content and quality parameters of mixed rye - Wheat bread. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.005>
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>
- Biluca, F. C., da Silva, B., Caon, T., Mohr, E. T. B., Vieira, G. N., Gonzaga, L. V., Vitali, L., Micke, G., Fett, R., Dalmarco, E. M., & Costa, A. C. O. (2020). Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, 129, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108756>
- Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D., & Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36(6), 527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7)
- Borsato, D. M., Prudente, A. S., Döll-Boscardin, P. M., Borsato, A. V., Luz, C. F. P., Maia, B. H. L. N. S., Cabrini, D. A., Otuki, M. F., Miguel, M. D., Farago, P. V., & Miguel, O. G. (2014). Topical Anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* Provided by *melipona marginata* during winter in Southern Brazil. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 817–825. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0024>
- Carina Audisio, M., Torres, M. J., Sabaté, D. C., Ibarguren, C., & Apella, M. C. (2011). Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003>
- Chanchoo, C. (2009). Antimicrobial activity by *Trigona Laeviceps* (stingless bee) honey from Thailand. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 25(3), 364–369.
- Chen, M., Sun, Q., Giovannucci, E., Mozaffarian, D., Manson, J. A. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2014). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes: 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *BMC Medicine*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0215-1>
- Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., Zwielehner, J., Bansal, N., & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91–97.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>

- Chikkamath, V., Kummari, S., Naik, V., & Nagappa, A. N. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotic on human health and disease - A review. *Manipal Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 19–24. https://search.proquest.com/docview/2135967470?accountid=8359%0Ahttp://ne4ke2fg4p.searc.h.serialssolutions.com?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/ProQ%3AAbiologicalscijournals&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft.genre=ar
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N. P., & Ustunol, Z. (2007). Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4005–4021. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-765>
- Coico, R. (2005). Gram staining. *Current Protocols in Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>
- Costa, A. C. V. da, Sousa, J. M. B., da Silva, M. A. A. P., Garruti, D. dos S., & Madruga, M. S. (2018). Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. *Food Research International*, 105, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.043>
- Currò, D., Ianiro, G., Pecere, S., Bibbò, S., & Cammarota, G. (2017). Probiotics, fibre and herbal medicinal products for functional and inflammatory bowel disorders. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1426–1449. <https://doi.org/10.1111/bph.13632>
- Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C., Silveira, N., Do Nascimento, M. D. S., & Gomes, R. A. R. (2013). Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. In *Institute of Food Technology - ITAL*.
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
- Dardón, M. J., & Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meloponini) deE Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 916–

- Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., & Ghosh, S. (2015). LWT - Food Science and Technology Evaluation of antioxidative , antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of Sesamum indicum honey containing phenolic compounds and lignans. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.044>
- Delves-Broughton, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 69(2), 193–202. <https://doi.org/10.1007/BF00399424>
- Doleyres, Y., Schaub, L., & Lacroix, C. (2005). Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4146–4156. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73100-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73100-3)
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321–1331. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.009>
- Eussen, S. J. P. M., Van Dongen, M. C. J. M., Wijckmans, N., Den Biggelaar, L., Oude Elferink, S. J. W. H., Singh-Povel, C. M., Schram, M. T., Sep, S. J. S., Van Der Kallen, C. J., Koster, A., Schaper, N., Henry, R. M. A., Stehouwer, C. D. A., & Dagnelie, P. C. (2016). Consumption of dairy foods in relation to impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus: The Maastricht Study. *British Journal of Nutrition*, 115(8), 1453–1461. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000313>
- FAO, E., & OMS, E. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Estudios FAO Alimentación y Nutrición*, 85, 52. <file:///C:/Users/Acer/Documents/paty/homework1/PROBIOTICOS OPS 2006.pdf>
- Feizabadi, F., Sharifan, A., & Tajabadi, N. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from stored Apis mellifera honey. *Journal of Apicultural Research*. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1765490>
- Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2015). Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An overview. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/412714>
- Fidaleo, M., Zuurro, A., & Lavecchia, R. (2011). Antimicrobial activity of some italian honeys against pathogenic bacteria. *Chemical Engineering Transactions*. <https://doi.org/10.3303/CET1124170>
- Fujimori, S., Tatsuguchi, A., Gudis, K., Kishida, T., Mitsui, K., Ehara, A., Kobayashi, T., Sekita, Y.,

- Seo, T., & Sakamoto, C. (2007). High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 22(8), 1199–1204. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04535.x>
- Furrie, E. (2005 C.E.). Probiotics and allergy. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 465–469. <https://doi.org/10.1079/pns2005466>
- G Vallianou, N. (2014). Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. *General Medicine: Open Access*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2327-5146.1000132>
- Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B., & Tsakalidou, E. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiology*, 33(1), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.008>
- George Kerry, R., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(3), 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, 20(2), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Ghouri, Y. A., Richards, D. M., Rahimi, E. F., Krill, J. T., Jelinek, K. A., & DuPont, A. W. (2014). Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 7, 473–487. <https://doi.org/10.2147/CEG.S27530>
- Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., & Sužnjević, D. Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.12.004>
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. de A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
- Han, X., Yang, Z., Jing, X., Yu, P., Zhang, Y., Yi, H., & Zhang, L. (2016). Improvement of the Texture of Yogurt by Use of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7945675>
- Hasali, N. H., Zamri, A. I., Lani, M. N., Mubarak, A., Ahmad, F., & Chilek, T. Z. T. (2018). Physico-

- chemical analysis and antibacterial activity of raw honey of stingless bee farmed in coastal areas in Kelantan and Terengganu. *Malaysian Applied Biology*.
- Hayek, S. A., Gyawali, R., Aljaloud, S. O., Krastanov, A., & Ibrahim, S. A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. In *Journal of Dairy Research*. <https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>
- Holzapfel, W. H. (2005). Introduction to prebiotics and probiotics. *Probiotics in Food Safety and Human Health*, 35, 1–33. <https://doi.org/10.1201/9781420027570.ch1>
- Homayouni, A., Alizadeh, M., Alikhah, H., & Zijah, V. (2012). Functional Dairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Probiotics*. <https://doi.org/10.5772/48797>
- Hong, S. J., Lee, S. Y., Lee, E., & Yang, S. I. (2016). Probiotics and allergic diseases. *Probiotics in Children*, 6(1), 161–181. <https://doi.org/10.5411/wji.v6.i1.75>
- Ilechie, A., Kwapong, Kyei, Mate-Kole, & Darko-Takyi. (2012). The efficacy of stingless bee honey for the treatment of bacteria-induced conjunctivitis in guinea pigs. *Journal of Experimental Pharmacology*, 63. <https://doi.org/10.2147/jep.s28415>
- Iqbal, M. Z., Qadir, M. I., Hussain, T., Janbaz, K. H., Khan, Y. H., & Ahmad, B. (2014). Review: probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 405–415.
- Ishikawa, Y., & Kitamura, M. (2000). Bioflavonoid quercetin inhibits mitosis and apoptosis of glomerular cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(2), 629–634. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4016>
- Islam, S. U. (2016). Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*, 95(5), e2658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>
- Jolly, L., Vincent, S. J. F., Duboc, P., & Neeser, J. R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 367–374. <https://doi.org/10.1023/A:1020668523541>
- Jonkers, D., & Stockbrügger, R. (2007). Review article: Probiotics in gastrointestinal and liver diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(SUPPL. 2), 133–148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03480.x>
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T. & Isolauri, E. (2007). Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(4), 1019–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.01.021>
- Kang, J. H., Yun, S. Il, Park, M. H., Park, J. H., Jeong, S. Y., & Park, H. O. (2013). Anti-Obesity

- Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in High-Sucrose Diet-Induced Obese Mice. *PLoS ONE*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054617>
- Khalisanni Khalid. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1–13.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., & Mukhtar, H. (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research*, 66(5), 2500–2505. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3636>
- Kießling, G., Schneider, J., & Jahreis, G. (2002). Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(9), 843–849. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601399>
- Kimoto-Nira, H., & Amano, K. (2008). Antimicrobial activity of honey produced by stingless honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 47(4), 325–327. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101484>
- Kıvanç, M., & Yapıcı, E. (2015). Kefir as a Probiotic Dairy Beverage: Determination Lactic Acid Bacteria and Yeast. *ETP International Journal of Food Engineering*, January 2015. <https://doi.org/10.18178/ijfe.1.1.55-60>
- Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak, I., Gaspar, L., Fusek, J., Rodrigo, L., & Kruzliak, P. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view. *Nutrition and Metabolism*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0067-0>
- Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., & Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>
- Kumul, R. C., Ruiz, J. C. R., Vázquez, E. O., & Campos, M. R. S. (2015). Potencial antioxidante de la miel de melipona beecheii y su relación con la salud: Una revisión. *Nutricion Hospitalaria*, 32(4), 1432–1442. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>
- Kustiawan, P. M., Puthong, S., Arung, E. T., & Chanchao, C. (2014). In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(7), 549–556. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2013-0039>
- Kwapong, P., Aidoo, K., Combey, R., & Karikari, A. (2010). Stingless bees: importance, management and utilisation. A training manual for stingless beekeeping. In *Social Insects* (Issue January).

- Lage, L. G. A., Coelho, L. L., Resende, H. C., Tavares, M. G., Campos, L. A. O., & Fernandes-Salomão, T. M. (2012). Honey physicochemical properties of three species of the Brazilian *Melipona*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 84(3), 605–608. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000051>
- Lamei, S., Hu, Y. O. O., Olofsson, T. C., Andersson, A. F., Forsgren, E., & Vásquez, A. (2017). Improvement of identification methods for honeybee specific Lactic Acid Bacteria; Future approaches. *PLoS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174614>
- Lani, M., Mohd Hasali, N., Zamri, A., Mubarak, A., & Suhaili, Z. (2015). Identification of lactic acid bacteria from Meliponine honey and their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 9(6), 1–6.
- Larsen, N., Vogensen, F. K., Van Den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., Hansen, L. H., & Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, K. E., Paek, K. S., Lee, Y., & Park, J. H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(7), 736–744. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.05.007>
- Lee, S. M., Ko, I. G., Kim, S. E., Kim, D. H., & Kang, B. N. (2010). Protective effect of catechin on apoptosis of the lens epithelium in rats with N-methyl-N-nitrosourea-induced cataracts. *Korean Journal of Ophthalmology : KJO*, 24(2), 101–107. <https://doi.org/10.3341/kjo.2010.24.2.101>
- Lim, Y. J., Jamaluddin, R., Hazizi, A. S., & Chieng, J. Y. (2018). Effects of synbiotics among constipated adults in serdang, selangor, malaysia—a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nu10070824>
- Loftus, E. V. (2004). Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), 1504–1517. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.063>
- Lusby, P. E., Coombes, A., & Wilkinson, J. M. (2002). Honey: a potent agent for wound healing? In *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society / WOCN*. <https://doi.org/10.1097/00152192-200211000-00008>
- MacFaddin, J. F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia*

clínica - Jean F. MacFaddin - Google Libros. Editorial Medica-Panamericana.

- Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (2004). Chemotaxonomic Analysis of Bacterial Populations Colonizing the Rectal Mucosa in Patients with Ulcerative Colitis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(12), 1690–1699. <https://doi.org/10.1086/420823>
- Macías-Macías, J. O., Quezada-Euán, J. J. G., Contreras-Escareño, F., Tapia-Gonzalez, J. M., Moo-Valle, H., & Ayala, R. (2011). Comparative temperature tolerance in stingless bee species from tropical highlands and lowlands of Mexico and implications for their conservation (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Apidologie*. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0074-0>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, 38(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.002>
- McAuliffe, O., Ross, R., Hill, C. (2002). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Microbiology Reviews*, 25, 285–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00579.x>
- Meo, S. A., Al-Asiri, S. A., Mahesar, A. L., & Ansari, M. J. (2017). Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 975–978. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>
- Mi, M., & Go, G. (2011). *1 Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México: Melipona beecheii y Scaptotrigona mexicana El Colegio de la Frontera Sur, Mayo 2011.*
- Mohd, N., Mohd, F., Sajap, a. S., Rosliza, J., & Suri, R. (2010). Conservation and sustainable utilization of stingless bees for pollination services in agricultural ecosystems in Malaysia. *International Seminar on Enhancement of Functional Biodiversity Relevent to Sustainable Food Production in ASPAC*, 1–11.
- Muhammad Rashidi Wahab, M. F. A. (2013). Jurnal Teknologi. *Jurnal Teknologi*, 3, 31–39.
- Muhalidin, B. J., Hassan, Z., & Sadon, S. K. (2011). Antifungal Activity of *Lactobacillus fermentum* Te007, *Pediococcus pentosaceus* Te010, *Lactobacillus pentosus* G004, and *L. paracasi* D5 on Selected Foods. *Journal of Food Science*, 76(7), 41–53. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02292.x>
- Muruke, M. H. (2014). Assessment of Quality of Tanzanian Honey based on Physicochemical Properties. *Food Sci Qual Manag*, 33(2001), 61–72.

- Ng, W. J., Lye, P. Y., Chan, Y. J., Lau, Z. K., & Ee, K. Y. (2017). Synergistic effect of trigona honey and ampicillin on *Staphylococcus aureus* isolated from infected wound. *International Journal of Pharmacology*, *13*(4), 403–407. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.403.407>
- Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ*, *2019*(8), 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.7478>
- Nweze, J. A., Okafor, J. I., Nweze, E. I., & Nweze, J. E. (2017). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: A comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. *BMC Research Notes*, *10*(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2884-2>
- OMS. (2021). *Obesidad y sobrepeso Datos y cifras*. Obesidad y Sobrepeso, Datos y Cifras. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández-Muiño, M. A., & Sancho, M. T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.005>
- Palumbo, V. D., Romeo, M., Gammazza, A. M., Carini, F., Damiani, P., Damiano, G., Buscemi, S., Lo Monte, A. I., Gerges-Geagea, A., Jurjus, A., & Tomasello, G. (2016). The long-term effects of probiotics in the therapy of ulcerative colitis: A clinical study. *Biomedical Papers*, *160*(3), 372–377. <https://doi.org/10.5507/bp.2016.044>
- Panel, E., Nda, A., & Golly, I. (2010). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, *8*(10), 1–18. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1763>
- Panesar, P. S. (2011). Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. *Food and Nutrition Sciences*, *02*(01), 47–51. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.21006>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E., Sidira, M., Kourkoutas, Y., Galanis, A., Tassou, C., & Chorianopoulos, N. G. (2019). Use of lactobacilli strains with probiotic potential in traditional fermented milk and their impact on quality and safety related to *Listeria monocytogenes*. *International Dairy Journal*, *98*, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.006>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(3), 521–542. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000300018>

- Patricia, V. (2002). Effect of stingless bee honey in selenite induced cataracts. *Apiacta*, 3(1), 1–2.
- Quezada-Euán, J. J. G., Paxton, R. J., Palmer, K. A., Itzá, W. D. J. M., Tay, W. T., & Oldroyd, B. P. (2007). Morphological and molecular characters reveal differentiation in a Neotropical social bee, *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponini). *Apidologie*, 38(3), 247–258. <https://doi.org/10.1051/apido:2007006>
- Quijano, G. (2011). The Benefits of Probiotics on Human Health. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, s1(01), 1–6. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.s1-003>
- Ramli, A. S., Luqman, A. H., Basrawi, F., Oumer, A. N., Aziz, A. A., & Mustafa, Z. (2017). A new cooling technique for stingless bees hive. *MATEC Web of Conferences*. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201713103013>
- Ranadheera, C. S., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., & Ajlouni, S. (2017). Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. non-dairy beverages. *Fermentation*, 3(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040067>
- Ranneh, Y., Ali, F., Zarei, M., Akim, A. M., Hamid, H. A., & Khazaai, H. (2018). Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.020>
- Rao, P., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(5), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(5), 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Rao, S. C., Athalye-Jape, G. K., Deshpande, G. C., Simmer, K. N., & Patole, S. K. (2016). Probiotic supplementation and late-onset sepsis in preterm infants: A meta-analysis. *Pediatrics*, 137(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3684>
- Rasane, P., Kailey, R., & Singh, S. K. (2017). Fermented indigenous Indian dairy products: Standards, nutrition, technological significance and opportunities for its processing. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 1199–1213. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.68>
- Reiner, K. (2010). Catalase-Test-Protocol [Internet]. *American Society for Microbiology*.
- Reyes-González, A., Camou-Guerrero, A., Reyes-Salas, O., Argueta, A., & Casas, A. (2014). Diversity, local knowledge and use of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the municipality of

- Nocupétaro, Michoacan, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-47>
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M. J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., ... Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., & Kok, J. (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2), 91–121. <https://doi.org/10.1080/10408690290825475>
- Ruan, Y., Sun, J., He, J., Chen, F., Chen, R., & Chen, H. (2015). Effect of probiotics on glycemic control: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PLoS ONE*, 10(7), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132121>
- Sánchez-Chino, X. M., Jiménez-Martínez, C., Ramírez-Arriaga, E., Martínez-Herrera, J., Corzo-Ríos, L. J., & Godínez García, L. M. (2019). Actividad antioxidante y quelante de metales de las mieles de *Melipona beecheii* y *Frieseomelitta nigra* originarias de Tabasco, México. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–7. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.186>
- Sánchez, I., Palop, L., & Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of “Almagro” eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00256-7)
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica*, 56(1), 45–59. <https://doi.org/10.4321/s2340-98942015000100007>
- Santos, F., Wegkamp, A., De Vos, W. M., Smid, E. J., & Hugenholtz, J. (2008). High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(10), 3291–3294. <https://doi.org/10.1128/AEM.02719-07>
- Schiwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190–195. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>
- Sgariglia, M. A., Vattuone, M. A., Sampietro Vattuone, M. M., Soberón, J. R., & Sampietro, D. A.

- (2010). Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. *Apidologie*, *41*(6), 667–675. <https://doi.org/10.1051/apido/2010028>
- Shah, T., Ali, N., Shah, Z., & Hayat, A. (2019). Antibacterial activity of Pakistani honey. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences*, *62*(2), 97–100.
- Shimizu, M., Hashiguchi, M., Shiga, T., Tamura, H. O., & Mochizuki, M. (2015). Meta-Analysis: Effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139795>
- Shokryazdan, P., Siew, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Faseleh Jahromi, M., & Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
- Simova, E. D., Beshkova, D. B., & Dimitrov, Z. P. (2009). Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(2), 692–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04052.x>
- Sinacori, M., Francesca, N., Alfonzo, A., Cruciata, M., Sannino, C., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014). Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiology*, *38*, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.013>
- Slaa, E. J., Alejandro, L., Chaves, S., Sampaio, K., Hofstede, F. E., Slaa, E. J., Alejandro, L., Chaves, S., Malagodi-braga, K. S., Elisabeth, F., S, E. J., & S, L. A. (2006). *Stingless bees in applied pollination : practice and perspectives To cite this version : HAL Id : hal-00892203 Review article Stingless bees in applied pollination : practice and perspectives OF POLLINATION IN COMMERCIALY GROWN.*
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, *5*(4), 1417–1435. <https://doi.org/10.3390/nu5041417>
- Song, S., Lee, S. J., Park, D. J., Oh, S., & Lim, K. T. (2016). The anti-allergic activity of *Lactobacillus plantarum* L67 and its application to yogurt. *Journal of Dairy Science*, *99*(12), 9372–9382. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11809>
- Sousa, J. M., de Souza, E. L., Marques, G., Meireles, B., de Magalhães Cordeiro, Â. T., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. *Food Research International*, *84*, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.012>
- Syed Yaacob, S. N., Huyop, F., Kamarulzaman Raja Ibrahim, R., & Wahab, R. A. (2018).

- Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 395–405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>
- T, B. (2018a). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 6(2). <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- T, B. (2018b). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 6(2), 89–94. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. Y. A., & Mustafa, S. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235–241. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.5.10>
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R., & Manap, M. Y. A. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 717–722. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300008>
- Takeda, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Dashnyam, B., Kawahara, S., Muguruma, M., Watanabe, W., & Kurokawa, M. (2014). Antiallergic activity of probiotics from Mongolian dairy products on type I allergy in mice and mode of antiallergic action. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.013>
- Tamime, A. Y., Wszolek, M., Božanić, R., & Özer, B. (2011). Popular ovine and caprine fermented milks. *Small Ruminant Research*, 101(1–3), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.021>
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2013). Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe*, 24, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.011>
- Tonucci, L. B., Olbrich dos Santos, K. M., Licursi de Oliveira, L., Rocha Ribeiro, S. M., & Duarte Martino, H. S. (2017). Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Nutrition*, 36(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011>
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>
- Villanueva-G, R., Roubik, D. W., & Colli-Ucán, W. (2005). Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán peninsula. *Bee World*, 86(2), 35–41. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099651>
- Vit, P., Medina, M., & Enríquez, M. E. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, 85(1), 2–5. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2004.11099603>
- Vit, P., Roubik, D. W., & Pedro, S. R. M. (2012a). Pot-Honey: A legacy of stingless bees. *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, August 2016*, 1–654. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Vit, P., Roubik, D. W., & Pedro, S. R. M. (2012b). Pot-Honey: A legacy of stingless bees. *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, January*, 1–654. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., & Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.012>
- Wang, J., Liu, H., Zhao, J., Gao, H., Zhou, L., Liu, Z., Chen, Y., & Sui, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules15085807>
- Wang, W., Luo, X., Zhang, Q., He, X., Zhang, Z., & Wang, X. (2020). *Bifidobacterium infantis* Relieves Allergic Asthma in Mice by Regulating Th1/Th2. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e920583. <https://doi.org/10.12659/MSM.920583>
- Wedajo, B. (2015). Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *Journal of Probiotics & Health*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000129>
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94(July 2018), 475–499. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>
- Yadav, H., Jain, S., & Sinha, P. R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.002>
- Yazan, L. S., Muhamad Zali, M. F. S., Ali, R. M., Zainal, N. A., Esa, N., Sapuan, S., Ong, Y. S., Tor,

- Y. S., Gopalsamy, B., Voon, F. L., & Syed Alwi, S. S. (2016). Chemopreventive Properties and Toxicity of Kelulut Honey in Sprague Dawley Rats Induced with Azoxymethane. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4036926>
- Yılmaz, İ., Enver Dolar, M., & Özpınar, H. (2019). Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(3), 242–253. <https://doi.org/10.5152/tjg.2018.18227>
- Yurrita, C. L., Ortega-Huerta, M. A., & Ayala, R. (2017). Distributional analysis of *Melipona* stingless bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation. *Apidologie*, 48(2), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0469-z>
- Zamora, G., Beukelman, K., Van Den Berg, B., Arias, M. L., Umaña, E., Aguilar, I., Sánchez, L. A., Fallas, N., Van Ufford, L. Q., & Gross, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 503–513. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.04>
- Zanon, P., Farrow, J. a E., Phillips, B. a, & Collins, M. D. (1987). *Lactobacillus pentosus*. *Genus*, 339–341.
- Zhang, H., Ren, W., Guo, Q., Xiong, Z., Wang, G., Xia, Y., Lai, P., Yin, B., & Ai, L. (2018). Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333. *Food Hydrocolloids*, 81, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.017>
- Zulkhairi Amin, F. A., Sabri, S., Mohammad, S. M., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Norhaizan, M. E., & Zawawi, N. (2018). Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6179596>

ANEXOS

Durante la maestría se trabajó en el desarrollo de un artículo científico sobre los alimentos y bebidas fermentadas alrededor del mundo y su efecto en la salud, principalmente realizando una revisión sobre los diferentes beneficios como coadyuvantes en el tratamiento y prevención de enfermedades como obesidad, diabetes y síndrome de intestino irritable.

DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040289>







fermentation



Review

Nutritional Contributions and Health Associations of Traditional Fermented Foods

Berenice Negrete-Romero ¹, Claudia Valencia-Olivares ¹, Gloria Andrea Baños-Dossetti ¹,
Beatriz Pérez-Armendáriz ¹ and Gabriel Abraham Cardoso-Ugarte ^{2,*}

¹ Facultad de Biotecnología, Decanato de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 Sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla 72410, Mexico; berenice.negrete01@upaep.edu.mx (B.N.-R.); claudia.valencia@upaep.edu.mx (C.V.-O.); gloriaandrea.banos@upaep.edu.mx (G.A.B.-D.); beatriz.perez@upaep.mx (B.P.-A.)

² Facultad de Gastronomía, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 Sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla 72410, Mexico

* Correspondence: gabrielabraham.cardoso@upaep.mx; Tel.: +52-229-9400

Abstract: The growing interest in the consumption and study of traditionally fermented food worldwide has led to the development of numerous scientific investigations that have focused on analyzing the microbial and nutritional composition and the health effects derived from the consumption of these foods. Traditionally fermented foods and beverages are a significant source of nutrients, including proteins, essential fatty acids, soluble fiber, minerals, vitamins, and some essential amino acids. Additionally, fermented foods have been considered functional due to their prebiotic content, and the presence of specific lactic acid bacterial strains (LAB), which have shown positive effects on the balance of the intestinal microbiota, providing a beneficial impact in the treatment of diseases. This review presents a bibliographic compilation of scientific studies assessing the effect of the nutritional content and LAB profile of traditional fermented foods on different conditions such as obesity, diabetes, and gastrointestinal disorders.

Keywords: traditional fermented foods; diabetes; obesity; irritable bowel syndrome; lactic acid bacteria



Citation: Negrete-Romero, B.; Valencia-Olivares, C.; Baños-Dossetti, G.A.; Pérez-Armendáriz, B.; Cardoso-Ugarte, G.A. Nutritional Contributions and Health Associations of Traditional Fermented Foods. *Fermentation* **2021**, *7*, 289. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040289>