



OFICINA DE REGISTRO Y FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	08 JUL 2019
Hora	16:28
Nº Ingreso	57884

Informe Técnico de Avance

Proyectos de Emprendimiento Innovador

Nombre del proyecto	"Desarrollo de un probiótico para fortalecer el sistema inmune en abejas (<i>Apis mellifera</i>)"
Código del proyecto	PYT-2017-0472
Nº de informe	3
Período informado	Desde el 11 de noviembre del 2018 hasta el 09 de julio del 2018
Fecha de entrega	09 de julio del 2019

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
 - Debe estar basada en la última versión del Formulario de Postulación aprobada por FIA.
 - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
 - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
 - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
 - Deben incluir toda la información que complemente y/o respalde la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
 - Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
 - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información
- Sobre la presentación a FIA del informe:
 - Se deben entregar tres copias iguales, dos en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
 - La fecha de presentación debe ser la establecida en la cláusula sexta del Contrato de ejecución. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
 - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.

1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Alejandra Ilabaca Faúndez
Nombre(s) Asociado(s):	Freddy Toledo
Coordinador del Proyecto:	Alejandra Ilabaca Faúndez
Regiones de ejecución:	Región del Biobío
Fecha de inicio iniciativa:	01/12/2017
Fecha término Iniciativa:	31/05/2019

2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

Costo total del proyecto			
Aporte total FIA			
Aporte Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total		

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA del proyecto		
1. Aportes entregados	Primer aporte	
	Segundo aporte	
	Tercer aporte	
	n aportes	
2. Total de aportes FIA entregados (suma N°1)		
3. Total de aportes FIA gastados		
4. Saldo real disponible (N°2 – N°3) de aportes FIA		
Aportes contraparte del proyecto (Ejecutor y asociados)		
1. Aportes Contraparte programado	Pecuniario	
	No Pecuniario	
2. Total de aportes Contraparte gastados	Pecuniario	
	No Pecuniario	
3. Saldo real disponible (N°1 – N°2) de aportes Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	

2.1 Saldo real de aporte FIA disponible en el proyecto

Indique si el saldo real disponible, señalado en el cuadro anterior, es igual al saldo en el Sistema de Declaración de Gastos en Línea (SDGL):

SI	x
NO	

2.2 Diferencia entre el saldo real de aporte FIA disponible y lo ingresado en el SDGL

En el caso de que existan diferencias, explique las razones.

--

3. RESUMEN DEL PERÍODO ANTERIOR

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos en el período anterior a éste informe. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

En este segundo periodo, se continuó con la caracterización de 9 cepas bacterianas seleccionadas anteriormente. En primer lugar se analizó la susceptibilidad de las cepas a diferentes antibióticos, mediante el ensayo de antibiograma. Se probaron 16 antibióticos, de los cuales, todas las cepas bacterianas mostraron ser susceptibles. Se realizó un análisis global de los resultados y se seleccionaron 3 cepas, denominadas: A14.2, A8.2 y A16.3, las cuales, cumplen con las características de una potencial cepa probiótica. Posteriormente, se procedió a realizar un ensayo específico con abejas vivas en condiciones de laboratorio (*ex situ*), para determinar la actividad inmunobiótica de las cepas previamente seleccionadas.

Los insectos sólo poseen sistema inmune innato, en el caso de las abejas frente al ataque de patógenos expresan péptidos antimicrobianos (PAMs), los cuales son un componente clave en la inmunidad innata de insectos. Estos péptidos cortos se liberan durante la infección bacteriana, fungal y protozoaria, y dañan las células microbianas perforando membranas e inhibiendo el plegamiento de proteínas. Los PAMs son producidos en los cuerpos grasos ubicados en el abdomen de las abejas y son liberados en la hemolinfa. Actúan provocando daño microbiano al perforar membranas, inhibiendo el plegamiento de proteínas y formando poros y canales que cambian la permeabilidad de membranas. La expresión de los PAMs de las abejas está regulada principalmente por dos vías de señalización intracelular, Toll e Imd/JNK. Sin embargo, la extensión de la expresión génica y la síntesis de péptidos se ve afectada por una serie de diferentes factores bióticos y abióticos.

En primer lugar, se procedió a administrar las cepas A14.2, A8.2 y A16.3, por separadas, a grupos de 10 abejas contenidas en mini colmenas, las cuales fueron montadas en el laboratorio. Este ensayo tuvo una duración de 5 días, donde el día 1 se alimentó con el probiótico y el resto de los días con jarabe de azúcar al 50%. Se determinó la expresión de 6 PAMs diferentes pertenecientes al sistema inmune de las abejas, para los cuales se utilizaron 7 partidores distintos, más un control interno. Se extrajeron los sistemas gastrointestinales a las 24 horas post administración y a los 5 días. A través, de la técnica qPCR se cuantificó la expresión de estos péptidos, los cuales fueron: Defensina 1, Abaecina, Apisimina, Apidaecina, Hymenoptaecina y Defensina 2.

Cada uno de estos péptidos, cumple un rol específico sobre el sistema inmune innato (**Tabla 8**).

En un primer ensayo, se observaron resultados similares entre la cepa A14.2 y la cepa A8.2, por lo que, se decidió realizar réplicas qPCR para poder visualizar de forma más exacta el fenómeno de inmunomodulación. Cabe señalar que la cepa A16.3 no presentó diferencias significativas con respecto al control durante la cuantificación de la expresión de los AMP quedando descartada. Como resultado, se observó que la cepa A14.2 es capaz de modular el sistema inmune de las abejas ya que produce un aumento significativo de Abaecina con respecto a la cepa A8.2 y con respecto al control a las 24 horas y una clara tendencia a aumentar de mejor manera defensina 1. Por otro lado, a los 5 días después de la administración de las cepas, se ve una tendencia de un aumento mayor de las moléculas Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2 de la cepa 14.2 en comparación con la cepa A8.2.

A través de estos últimos ensayos se determinó que la cepa A14.2 presenta una actividad inmunomoduladora más fuerte en la abeja que las demás cepas.

Para finalizar, antes de realizar el estudio de campo en el apiario, se determinó la cinética de crecimiento de la cepa A14.2. Para esto, en primer lugar se realizaron dos curvas de crecimiento a 37°C, en condiciones de aerofilia y microaerofilia. Se obtuvieron los siguientes parámetros de crecimiento para la cepa A14.2:

1. Su fase de crecimiento exponencial está entre las 12-14 horas.
2. Su velocidad de crecimiento es de aproximadamente 0,19 (horas⁻¹).
3. Su tiempo de duplicación es de 1,55 (horas).

Se observa que para ambas condiciones estos parámetros no fueron significativamente diferentes.

Con motivos tecnológicos y de futuro escalamiento, se determinó la capacidad de crecimiento y sobrevivencia bacteriana en medio rico en azúcar, con el objetivo de ver si la cepa A14.2 mantiene su viabilidad durante el tiempo. Sorprendentemente la cepa A14.2 se mantiene viable en caldo MRS suplementado con 50% de azúcar y con 100% de azúcar, lo cual nos permitiría poder administrar el probiótico en agua con azúcar sin ningún problema. Esto tiene importancia ya que un grupo de Argentina demostró que su cepa probiótica (*Lactobacillus johnsonii* CRL1647) se mantenía viable en medio con 50% de azúcar y no podía sobrevivir en medio con 100% de azúcar (Audisio et al., 2011), lo que nos permite sugerir que la cepa A14.2 muestra alta capacidad de resistir ambientes estresantes.

Por medio de los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir que la cepa A14.2 presenta las mejores propiedades tanto en los ensayos *in vitro* como *ex situ*. Se podría sugerir que la cepa A14.2 tiene un efecto robusto en la activación del sistema inmune en abejas, de manera individual y social, ya que aumenta los péptidos antimicrobianos Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2. El posible mecanismo de acción de la cepa podría estar relacionado con la activación de los receptores tipo Toll a través de los genes DORSAL y, además, los receptores IMD por la activación de Abaecina, manteniéndose esta respuesta por lo menos 5 días post administración de la cepa. Asimismo, crece en aerofilia y microaerofilia y tiene la capacidad de mantenerse viable en medio con altas concentraciones de azúcar (50% y 100%). Por lo tanto, la cepa potencialmente probiótica A14.2 fue seleccionada para ser administrada en los apiarios a escala piloto.

4. RESUMEN DEL PERÍODO INFORMADO

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos en el período informado. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

En este último periodo del proyecto, se realizaron las actividades que faltaban para finalizar esta etapa. En primer lugar se realizó la administración de la cepa seleccionada, A14.2, a través de los criterios de pruebas en el laboratorio y por medio del experimento *ex situ* en abejas vivas.

Se realizó la administración de la cepa A14.2 en el apiario del asociado Freddy Toledo ubicado en Nonguén, Región del Biobío. El tiempo de duración fue de cuatro meses, desde diciembre del año 2018 hasta Marzo del año 2019, donde el probiótico se administró cada un mes a tres colmenas en el agua con azúcar, en paralelo y al mismo tiempo tres colmenas fueron controles ya que sólo se alimentaron con agua con azúcar sin la cepa probiótica.

Cada vez que se realizaba una administración se tomaban muestras de abejas para determinar parámetros de las colmenas como número de abejas y producción de miel, por otro lado se realizó recuento de los patógenos *Varroa destructor* y *Nossema ceranae* a lo largo de toda la administración del probiótico.

Por otra parte, para complementar los resultados, se solicitó por medio de la externalización de servicios a terceros, a la empresa Functional Life, un análisis del producto de las colmenas del Apiario de Don Freddy, es decir, la miel, para conocer sus propiedades antioxidantes y contenido de polifenoles.

Además, en este periodo se realizó un estudio de negocio realizado por Mario Rivas, que será adjuntado al informe final del proyecto. También se hizo el diseño del prototipo probiótico por medio de un publicista, quien diseñó la marca de Probeeotic y sus posibles usos en diferentes materiales de difusión.

Por medio de los resultados obtenidos hasta este periodo se puede concluir que A14.2, es la cepa que presenta las mejores propiedades tanto en los ensayos *in vitro* como *ex situ*. Se puede sugerir que la cepa A14.2 tiene un efecto robusto en la activación del sistema inmune en abejas, de manera individual y social, ya que aumenta los péptidos antimicrobianos Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2. El posible mecanismo de acción de la cepa podría estar relacionado con la activación de los receptores tipo Toll a través de los genes DORSAL y, además, los receptores IMD por la activación de Abaecina, manteniéndose esta respuesta por lo menos 5 días post administración de la cepa. Asimismo, crece en aerofilia y microaerofilia y tiene la capacidad de mantenerse viable en medio con altas concentraciones de azúcar (50% y 100%). Por lo tanto, la cepa potencialmente probiótica A14.2 fue seleccionada para ser administrada en los apiarios a escala piloto.

Esto es consistente con los resultados obtenidos en el apiario, ya que, se observa que el probiótico es capaz de mantener, y por lo tanto, disminuir la infección de Varroa en las colmenas que se les administró la cepa A14.2 y además, es capaz de mantener la carga de esporas de Nosema, disminuyendo la infección por este patógeno. Esto quiere decir que nos encontramos con una cepa de gran potencial, capaz de mantener las colmenas sanas y protegidas contra los principales patógenos que afectan a las abejas.

Por lo tanto, esto podría traer grandes beneficios para el sector apícola, ya que, disminuirían las pérdidas de insumos apícolas, disminuiría la mortalidad de las abejas y aumentaría la producción de productos de las colmenas como miel y sus derivados.

Finalmente mencionar, que por medio de la difusión del prototipo realizado, el sector apícola lo recepcionó de una manera muy positiva y con mucho interés de adquisición del producto en un futuro muy cercano.

5. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Desarrollar un prototipo de alimento probiótico para fortalecer el sistema inmune de las abejas (*Apis mellifera*) a partir de bacterias ácido lácticas aisladas de las mismas abejas pertenecientes a la región del Biobío y a su vez desarrollar un estudio de modelo de negocio para comercializar el producto.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

6.1. Porcentaje de Avance

El porcentaje de avance de cada objetivo específico se calcula luego de determinar el grado de avance de los resultados asociados a éstos. El cumplimiento de un 100% de un objetivo específico se logra cuando el 100% de los resultados asociados son alcanzados.

Nº OE	Descripción del OE	% de avance a la fecha
1	Obtener 10 colmenas de tres apiarios de diferentes localidades la Región del Biobío y aislar cepas probióticas a partir de las distintas abejas seleccionadas.	100%
2	Desarrollar modelo de negocio del producto a través de realización de flujo de caja, estudio de mercado y competencias, tamaño de mercado y beneficiarios.	100%
3	Determinar las propiedades probióticas de las cepas aisladas, entre ellas, su actividad anti-Varroa y actividad inmunomoduladora.	20%
4	Diseñar un prototipo probiótico y análisis de propiedad intelectual.	50%
5	Difundir el prototipo probiótico en ferias apícolas y agrícolas del país para llegar a futuros compradores del producto.	75%

7. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

7.1. Cuantificación del avance de los RE a la fecha

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
1	1	Muestras de abejas de al menos 3 Apiarios de la Región del Biobío.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
El muestreo de los 3 apiarios, se realizó durante los meses de febrero, marzo y abril del 2018. Se comenzó después del periodo estimado, ya que, el dinero del proyecto llegó a fines de enero, y además, el tiempo involucrado a aislar cepas, tomó más tiempo de lo esperado. Por lo tanto, el tiempo de trabajo entre cada muestreo fue mayor para lograr el objetivo deseado. Se trabajó en total con 147 abejas.			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
Figura 2 y Figura 3			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
2	3	Realiza una caja de flujo al comienzo de la ejecución del proyecto con la ayuda de Incuba UdeC, para determinar en qué se gastará el dinero y en qué momento.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se realizó una caja de flujo que ayudó a determinar los posibles escenarios esperados y la puesta en marcha de nuestro producto.			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
2	5	Análisis del impacto potencial del producto en la industria apícola y agrícola.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se realizó un informe sobre el análisis de mercado y potencial producto en la industria agrícola y apícola de Chile con la ayuda de IncubaUdeC. El informe indica proyecciones hacia el 2025 acerca del crecimiento del mercado apícola y además, el porcentaje que podríamos abarcar en dicho mercado. Se adjuntan algunas tablas que se realizaron en los anexos.			
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)			
Tabla 2 y 3. Anexo 3.			

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
2	4	Análisis de competidores de mercado y cuál servicio vamos a reemplazar.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se realizó un informe sobre el análisis de competidores y el servicio que reemplazarían, con la ayuda de IncubaUdec. Como nuestro producto no tiene competidores aún, se llega a la conclusión de que tiene una buena proyección con respecto a las ventas en el mercado, pero el desafío es cómo llegar a los futuros clientes.			
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)			
Tabla 2 y 3. Anexo 3.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
3	6	Crecimiento y aislamiento de bacterias ácido lácticas en medio MRS de a lo menos 3 apiarios de la Región del Biobío.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Luego de la obtención de las muestras, se procedió a cultivar el tracto gastrointestinal en el medio selectivo agar MRS, para la obtención de las bacterias lácticas. A las cepas que lograron crecer y ser aisladas, se le realizaron una serie de trasposos y ensayos de identificación, de las cuales, fueron seleccionadas las que cumplían con los criterios. Primero, una cepa pura, Gram positiva, bacilar con morfología macro y microscópica identificada. Posteriormente, se almacenaron en refrigerador a -20°C para su mantención en el tiempo. Las bacterias no puras se descartaron para seguir avanzando en el proyecto. Es importante recalcar que esta etapa es sumamente difícil y toma tiempo desarrollar. La etapa de mayor dificultad es lograr que las cepas bacterianas sean puras, ya que éstas viven en simbiosis, es decir, en una mezcla de muchos microorganismos. Finalmente, se realizaron pruebas de detección por PCR para la identificación y caracterización de las cepas del género de <i>Lactobacillus</i>.			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
Figura 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Además tabla 1.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
3	7	Resistencia de cepas de bacterias ácido lácticas a pH ácido.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se realizó el crecimiento de cepas bacterianas previamente seleccionadas a través de PCR a pH 4.0 y 6.9, correspondientes a pH del tracto gastrointestinal de las abejas. Este ensayo se hizo para descartar las cepas que no crecen en dichos pH con el fin de que cuando se administre el probiótico resistan a esas condiciones. Anterior a esta prueba, se realizó el ensayo en diferentes porcentajes de azúcar, donde de 22 cepas seleccionadas por PCR, 16 crecieron. Estas 16 cepas se llevaron a pH 4.03 y pH 6.9, donde se determinó que 9 cepas eran capaces de crecer de manera abundante en estas condiciones. Esto quiere decir que resisten a dichos pH, como se muestra en la tabla 6.			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
Tabla 6			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	vance a la fecha
3	8	Viabilidad de cepas ácido lácticas a diferentes concentraciones de azúcar.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Este resultado esperado se modificó debido a que una de las pruebas probióticas <i>in vitro</i> que se realizan comúnmente es el ensayo a diferentes concentraciones de sales biliares, pero con el transcurso del proyecto se determinó que no era necesario si se iba a administrar a abejas, ya que éstas no secretan líquido biliar. Debido a lo mencionado anteriormente se propuso realizar un ensayo de diferentes concentraciones de azúcar, ya que, el producto se va a administrar a través del jarabe (agua con azúcar) de las abejas. Por lo tanto, se realizó un ensayo donde se incubaron las 22 cepas seleccionadas a través de PCR en medio de crecimiento con 25% y 50% de azúcar, para saber si se observaba o no crecimiento bacteriano a través de turbidez. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 5 .			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
Tabla 5, Figura 12.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	vance a la fecha
3	9	Perfil de susceptibilidad a antibióticos.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
En este objetivo se procedió a realizar un antibiograma usando 17 discos de antibióticos diferentes. Estos antibióticos fueron: Cefuroxina, Ampicilina, Gentamicina, Nistatina, Cloranfenicol, Kanamicina, Amikacina, Trimetoprima-sulfametoxazo, Ciprofloxacina, Colistina, Rifampicina, Vancomicina, Neomicina, Eritromicina, Estreptomicina, Claritromicina y Penicilina. Se realizó el ensayo de difusión en agar, el cual consistió en lo siguiente: se realizaron suspensiones bacterianas con las cepas a ensayar a la concentración de Mc Farland 0.5 en suero fisiológico estéril, se sembró 100 µL de las suspensiones bacterianas en placas de agar MRS, posteriormente se inocularon los discos de antibiótico, en las placas, utilizando un máximo de 5 discos por placa. Posteriormente, las placas se incubaron en estufa de microaerofilia a 37°C durante 48 h. Al cabo de las 48 h se midieron los halos de inhibición con regla milimetrada y se reportaron en mm. El criterio utilizado fue descrito por Giorgieva y col. (2008), donde la susceptibilidad es expresada como: R- sin inhibición; MS (medianamente sensible)- zona de inhibición entre 7-16 mm; S (sensible)-16-25 mm; SS (altamente sensible)- más de 25 mm; ND – no determinado. Las cepas seleccionadas fueron aquellas que presentaban un buen perfil de susceptibilidad y características superiores en los ensayos previos (Tabla 6). Cabe decir, que por literatura se ha reportado que algunos géneros de <i>Lactobacillus</i> presentan resistencia intrínseca a ciertos antibióticos y esto se ve al compararlo con la cepa control de <i>Lactobacillus</i> UCO-25A de origen humano (Kanamicina, Trimetoprim-sulfametoxazol, Colistina, Vancomicina).			

Debido a lo mencionado anteriormente, este ensayo sólo nos brinda información respecto al perfil de susceptibilidad de las cepas, pero no fue determinante al momento de seleccionar aquellas que pasaban a la siguiente etapa de ensayos, ya que, bajo los criterios mencionados anteriormente, todas las cepas ensayadas resultaron ser de medianamente a altamente susceptible a los antibióticos probados.
Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)
Figura 14. Tabla 6.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	vance a la fecha
3	10	Actividad hemolítica	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
No se puede hacer el ensayo de actividad hemolítica, ya que, las abejas no tienen sangre si no que hemolinfa. El ensayo hemolítico se realiza con placas bacterianas con agar mezclado con cierto porcentaje de sangre. Con respecto a esto, se analizó la posibilidad de extraer la hemolinfa y poder realizar un ensayo homólogo. Sin embargo, este procedimiento es largo, engorroso y tiene dificultades técnicas que hubiesen retrasado la realización de otros ensayos cruciales durante este proyecto.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	% de avance a la fecha
3	11	Pruebas <i>in vivo</i> para evaluar si modula (aumenta o disminuye) el sistema inmune en abejas y selección de la mejor bacteria probiótica.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Para la realización de esta etapa y la obtención de los resultados esperados comprometidos en este objetivo específico, fue necesario dividir el trabajo en tres grandes etapas: 1) Administración de 3 cepas probióticas preseleccionadas a escala de laboratorio para determinar su capacidad inmunomoduladora en abejas. Con el objetivo de determinar y seleccionar la cepa bacteriana con actividad inmunomoduladora, se realizó un montaje de crianza de abejas a escala de Laboratorio. Esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción por un periodo de cinco días. Para ello, se construyeron con vasos plásticos mini colmenas, con las condiciones necesarias para su mantenimiento: un trozo de cera, un alimentador, un bebedero, y además, orificios para permitir la circulación de aire. Las mini colmenas fueron mantenidas a 37°C, durante todo el ensayo. Se construyeron 10 mini colmenas en total, y en cada una se ubicaron 10 abejas pecoreadoras en su interior, obtenidas desde el Apiario Nonguén. Para la administración de las cepas probióticas se crearon 5 grupos (Tabla 7) (denominados de la letra A a la E), cada uno formado por 2 mini colmenas (Figura 15). El primer día, al grupo A se alimentó con la cepa A14.2 a una concentración final de 1×10^5 (ufc/mL) en jarabe de azúcar al 50%. Al grupo B se alimentó el primer día con la cepa A8.2 a una concentración final de 1×10^5 (ufc/mL) en jarabe de azúcar al 50%. Al grupo C se alimentó el primer día con la cepa A16.3 a una concentración final de 1×10^5 (ufc/mL) en jarabe de azúcar al 50%. Al grupo D se alimentó el primer día con jarabe de azúcar al 50% + caldo MRS estéril. Al grupo E se alimentó el primer día con jarabe de azúcar al 50%. Desde el segundo al quinto día todos los grupos se alimentaron con jarabe de azúcar al 50%. Los grupos se mantuvieron en estufa a 37°C, en ambiente húmedo hasta el día del sacrificio. A las 24 horas y 5 días post administración se sacrificaron las abejas, una mini colmena por grupo. Para esto las abejas se dejaron a 4°C durante 20 min hasta que se adormecieron, se extrajo el sistema gastrointestinal de 7 abejas por mini colmena y se mantuvo en buffer RNA later para evitar degradación de RNA, hasta la realización de la extracción. Las muestras se almacenaron en frío a 4°C por 24 horas y luego se almacenaron a -80°C hasta su uso. Durante este experimento, no se observaron efectos adversos post administración de las distintas cepas bacterianas a las abejas, es decir, el 100% de las abejas permanecieron vivas, con un comportamiento individual y social activo, lo que permite concluir que las bacterias ensayadas en este punto son inocuas en las cantidades ensayadas para el insecto. Ensayo de qPCR para la cuantificación de moléculas del sistema inmune en abejas: Para determinar qué cepa probiótica genera una respuesta en el sistema inmune se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), una técnica que permite cuantificar la expresión de genes. La abeja presenta un sistema inmune innato, donde participan moléculas específicas llamadas péptidos antimicrobianos (PAMs), las cuales, pueden aumentar o disminuir según el estímulo que reciba el organismo. En la Tabla 8 se presentan seis péptidos más una isoforma adicional descritos en abejas que participan en la respuesta de su sistema inmune, de los cuales se mandaron a pedir siete partidores específicos que permiten amplificar el gen de estas moléculas para poder ser detectadas y cuantificadas mediante el ensayo de qPCR, más un gen de control interno, cuya expresión permanece constante independiente de los factores que afectan a la			

abeja. Esto por lo tanto, fue medido luego de haber sido administrada a las abejas las cepas probióticas preseleccionadas.

Para ello, a partir del sistema gastrointestinal, se extrajo RNA total con TRizol, de cada uno de los grupos mencionados en el apartado anterior. Posteriormente, a través de la enzima transcriptasa reversa (RT) se transcribió el ARN a ADN copia (cADN), y finalmente, se utilizó Sybrgreen, un colorante fluorescente que se une a la molécula de ADN, el cual permite cuantificar al final de cada ciclo la amplificación de ADN. En cuanto a los resultados, los primeros análisis que se realizaron fueron con respecto a los controles utilizados, en este caso jarabe de azúcar al 50% y jarabe de azúcar al 50% inoculado con caldo MRS estéril. De acuerdo a esto se llegó a la conclusión de que el caldo MRS estéril no es un buen control para este tipo de experimentos ya que también es capaz de producir cambios en la expresión de las moléculas del sistema inmune en las abejas. Por lo que, todos los gráficos presentados en este proyecto y los cambios en la expresión del sistema inmune están hechos con relación al estado basal que sería aquellas abejas alimentadas solamente con jarabe de azúcar.

En la **Figura 16, 17 y 18**, se observa como las cepas ensayadas A14.2 y A8.2, tienen la capacidad de generar cambios en la expresión de los AMPs en abejas, observándose que tanto la cepa A14.2 como la cepa A8.2 son las que poseen mayor poder inmunomodulador sobre el sistema inmune de abejas. La cepa A16.3 se eliminó de los resultados ya que no mostraba estimulación de su sistema inmune. Al analizar este resultado se decidió realizar un ensayo extra, para estas dos cepas y determinar cuál de las dos es capaz de estimular de forma significativa el sistema inmune. Para esto se repitió el ensayo de qPCR por triplicado obteniéndose el gráfico presentado en las **Figura 16, 17 y 18**. La cepa A14.2 es capaz de estimular la expresión de los péptidos antimicrobianos Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2 a las 24 horas post administración, donde el aumento de Abaecina y Defensina 2 por la cepa A14.2 tiene una diferencia significativa con respecto al control, así se sugiere una tendencia clara de que la cepa A14.2 aumenta de mayor manera los péptidos antimicrobianos en comparación con la cepa A8.2 (**Figura 16**). Por otro lado, a los 5 días se observa que ambas cepas aumentan las moléculas Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2 (**Figura 17**), donde la cepa A14.2 aumenta significativamente las moléculas Defensina 1 y Defensina 2 con respecto al control (**Figura 17**). Cabe destacar que a los 5 días se observa un fenómeno donde la molécula defensina 1 aumenta de manera sorprendente y se escapa de los puntos, a pesar de eso quisimos mostrarlo como un resultado favorable para la cepa A14.2 (**Figura 17**).

Esto quiere decir que la cepa A14.2 tiene una clara tendencia a estimular de mejor manera el sistema inmune en abejas que la cepa A8.2, tanto a las 24 horas como a las 5 días post administración de las potenciales cepas probióticas.

Se sabe a través de literatura que la microbiota normal de las abejas aumenta los péptidos antimicrobianos, en especial Apidaecina e Hymenoptaecina (Kwong *et al.*, 2017). Pero nuestros resultados nos muestran que las cepas aisladas del tracto gastrointestinal no aumentan dichos péptidos y puede deberse a que poseen otro mecanismo de acción diferente. Por otro lado, se ve un aumento de Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2, tanto a las 24 horas como a los 5 días post administración de la cepa A14.2.

El péptido Defensina 1 está relacionado con las defensas contra parásitos y defensa inmune “social”, lo cual sería muy favorable para nuestro futuro producto ya que podría ir dirigido contra *Varroa* que es el principal patógeno que ataca a las abejas en los apiarios. Además, Defensina 1 y Abaecina están ligados al mecanismo de acción de activación de los receptores tipo toll en abejas por medio de los genes DORSAL, los cuales se relacionan con las defensas contra bacterias Gram positivas y hongos, ya que son capaces de detectar moléculas específicas del peptidoglicán (Lourenco *et al.*, 2018). Se realizó un estudio en abejas vivas (Evans y López, 2004) donde se les administró un probiótico (*L. rhamnosus* (20%), *L. casei* (20%), *L. plantarum* (10%), *L. acidophilus* (20%), *B. longum* (20%), y *B. breve* (10%)), donde se observó un incremento en el péptido antimicrobiano Abaecina. Los autores expresan que el aumento ocurre a partir de las 12 horas post administración del probiótico y que tiene un efecto contra el patógeno *P. larvae*. Esto se puede extrapolar a nuestros resultados, indicando que la cepa A14.2 podría tener efecto contra patógenos bacterianos de abejas.

Por otro lado, la estimulación del péptido antimicrobiano Defensina 2 se mantiene tanto a las 24

horas como a los 5 días post administración de la cepa A14.2, lo cual es consistente con la literatura ya que dice que se mantiene durante dos semanas aproximadamente (Ilyasov et al., 2012). La activación de esta molécula es favorable para nuestros resultados, ya que indicaría una respuesta individual de las abejas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En base a los resultados obtenidos, se sugiere que la cepa A14.2 tiene un efecto robusto en la activación del sistema inmune en abejas, de manera individual y social, ya que, aumenta los péptidos antimicrobianos Abaecina, Defensina 1 y Defensina 2. El posible mecanismo de acción de la cepa podría estar relacionado con la activación de los receptores tipo Toll a través de los genes DORSAL y, además, los receptores IMD por la activación de Abaecina manteniéndose esta respuesta por lo menos 5 días post administración de la cepa.

2) Determinación de cinética de crecimiento bacteriano para la cepa A14.2 en condición de aerofilia (presencia de oxígeno) y microaerofilia (baja concentración de oxígeno):

La administración de un probiótico depende de sus características biológicas y tecnológicas que aseguren que el producto sea escalable de manera efectiva. Las bacterias del género *Lactobacillus*, a pesar de tener excelentes propiedades en cuanto su uso en la salud tanto humana como animal, suele presentar inconvenientes de tipo tecnológicos al momento de realizar escalamientos y producción en masa, esto debido a ser una bacteria de altos requerimientos nutricionales, lo que encarece la producción, provocando muchas veces que la realización de un producto sea inviable. Con respecto a este punto, es común encontrar cepas de este género que tengan poca tolerancia a las concentraciones normales de oxígeno, lo que provoca que el escalamiento en biorreactores a condiciones de baja concentración de oxígeno sea demasiado costoso para producirlo, es por eso, que se analizó a la capacidad de la cepa A14.2 para crecer en distintas condiciones de concentración de oxígeno y cuales son su respectiva velocidad de crecimiento en las distintas condiciones.

Con este ensayo se obtuvieron dos resultados cruciales:

- 1.- La capacidad de la cepa para crecer en ambientes que permitan asegurar su escalabilidad a costos mínimos
- 2.- El tiempo en que la bacteria se debe cosechar para posteriormente ser añadida o administrada a las abejas, y exprese al máximo sus propiedades benéficas.

Para esto se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Se sembraron en placa de agar MRS por estriado la cepa A 14.2 por 48 h en condiciones de microaerofilia.
- 2) En tubo de vidrio estéril con 5 mL de suero fisiológico se realizó una suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 ufc/mL.
- 3) Una vez lista la suspensión se agregaron 5 mL de suero fisiológico para ajustar la suspensión a una concentración 10^6 ufc/mL.
- 4) Se agregaron 500 uL de la suspensión a dos matraces estériles con 50 mL de caldo MRS cada uno para obtener una concentración inicial de 10^5 ufc/mL.
- 5) De esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta -5 y sembraron 10 uL por triplicado de cada suspensión en dos placas de agar MRS a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 48 h
- 6) Un matraz se dejó durante todo el experimento incubando a 37°C en condiciones de aerofilia (concentración ambiental de oxígeno) y el otro matraz se incubó a 37°C en condiciones de microaerofilia.
- 7) Las placas de la microgota se incubaron en microaerofilia por 48 h, y posteriormente se realizó el recuento de las colonias.
- 8) Los datos se graficaron obteniendo las respectivas desviaciones de cada curva, además se calcularon los parámetros de velocidad de crecimiento (horas^{-1}) y tiempo de duplicación (g)

En la **Figura 19**, se visualizan las curvas de crecimiento para la cepa A14.2 en condición de microaerofilia y aerofilia, respecto a los datos entregados por las curvas se evidencia que el crecimiento de la bacteria para ambas condiciones es idéntico, no encontrándose diferencias significativas al respecto, por lo que, la bacteria presenta buenas características de tolerancia al oxígeno, lo que en un futuro haría más fácil y económico el proceso de escalamiento. Los

parámetros obtenidos para ambas condiciones se observan en las **tablas 10 y 11**. Además, se determinó que la fase de crecimiento exponencial se encuentra entre las 12-14 horas, por lo que, es este momento donde debe ser cosechada la biomasa para ser administrada a las abejas y la cepa bacteriana presente todas sus propiedades.

2) Determinación de cinética de crecimiento bacteriano para la cepa A14.2 en caldo MRS con 50% de azúcar y 100% de azúcar

La alimentación de las abejas por parte de los apicultores en el apiario, consiste en la aplicación de jarabe de agua con azúcar a una concentración del 100% lo que equivale a 1 g de azúcar por 1 mL de agua. Normalmente las bacterias no son capaces de sobrevivir a concentraciones elevadas de azúcar, por lo que, una característica tecnológica fundamental que debe presentar una bacteria que será administrada mediante este medio, es una alta tolerancia a concentraciones elevadas de azúcar.

Es por esto que se determinó si la cepa se mantiene viable en condiciones altas de azúcar (50% y 100%). Para ello, se realizó una cinética de crecimiento bacteriano en caldo MRS suplementado con 50% de azúcar y 100% de azúcar, siguiendo el mismo protocolo del ensayo anterior.

Como se observa en la **Figura 20** la cepa A14.2 se mantiene viable durante 48 horas en concentraciones de 50 y 100 % de azúcar. Además, a la concentración de 50% de azúcar luego de las 24 horas de incubación la bacteria es capaz de crecer en este medio. Esta información nos permite asegurar que la cepa probiótica será capaz de mantenerse viable al ser administrado a través del jarabe de azúcar, hasta que sea consumido por las abejas, lo que asegura que la cepa A14.2 pueda efectuar su potencial benéfico en el apiario.

3) Administración de cepa probiótica en Apiario:

En curso.

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Figuras 15, 16, 17, 18, 19 y 20. Tablas 8, 9, 10 y 11.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	12	Pruebas <i>in vivo</i> para evaluar si aumenta el sistema inmune en abejas y selección de la mejor bacteria probiótica.	
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Esta etapa tuvo una duración de 4 meses, que desde diciembre de 2018, hasta marzo de 2019. Esta etapa consistió en la administración de la cepa probiótica A-14,2, suspendida en jarabe de azúcar (1:1). La administración se realizó en 6 colmenas pertenecientes al apiario del asociado Freddy Toledo, ubicado en el sector de Nonguén. En diciembre de 2018 se prepararon los núcleos de colmenas de <i>novo</i>, con la intención de que todos los cajones tratados empezaran teniendo los mismos parámetros y el error al cuantificar estos fueran mínimos. De las 6 colmenas que estuvieron en el estudio a 3 se le aplicó el probiótico y las otras 3 se usaron como control del tratamiento. Para todas las colmenas se evaluaron los siguientes parámetros una vez al mes: 1) Detección y cuantificación del patógeno <i>Varroa destructor</i> 2) Detección y cuantificación del patógeno <i>Nosema ceranae</i> 3) Crecimiento de población por cajón y aspecto biológico 4) Producción de miel			

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada parámetro

5) Detección y cuantificación del patógeno *Varroa destructor*

Para evaluar este parámetro una vez al mes se tomaban muestras representativas de abejas por colmenas (mínimo 100 abejas por colmena), estas se trataban con detergente para soltar el ácaro de la piel de los insectos y luego las abejas se pasaban por un tamiz que separa los ácaros de las abejas y se procedió a realizar recuento de varroa por colmena.

El porcentaje de infestación se obtuvo del cociente entre el número de ácaros y el número de abejas analizadas, multiplicado por cien (Dietemann y col, 2013; OIE, 2012)

Resultado

Durante todo el proceso de administración piloto se trató los cajones con ácido oxálico sublimado, tratamiento que se utiliza para mantener los recuentos de varroa estables dentro del apiario. A pesar, que tanto los cajones tratamiento como los controles ya eran periódicamente tratados contra el acaro, si se observó una tendencia entre las colmenas tratadas, las cuales en su mayoría mantenían recuentos estables en comparación a las colmenas control (Tabla 11). En los resultados presentados se puede observar que todos los cajones comenzaron el tratamiento con un porcentaje de infestación igual o menos al 2%, al cabo de los cuatro meses en marzo de 2019 los cajones tratados presentaban: 0, 2 y 1% de infestación del patógeno respectivamente, mientras que los cajones controles presentaban infestaciones de 0, 4 y 2% respectivamente, De acuerdo al manual apícola entregado por el SAG el año 2018 (Manual Manejo-Sanitario Apícola del Departamento de Sanidad Animal, División Protección Pecuaria. Servicio Agrícola y Ganadero, 2018), una tasa de infestación aceptable no debe superar el 3% en abejas adultas y tasas superiores al 5% generan pérdidas productivas importantes y causan daño en la sobrevivencia de las abejas. Por lo que, los resultados obtenidos sugieren el uso del ProBEEotic en conjunto con un tratamiento probado para el control de varroa, mantiene los niveles de infestación de varroa en un porcentaje tal que no produce daño alguno en la colmena.

6) Detección y cuantificación del patógeno *Nosema ceranae*

Para evaluar este parámetro una vez al mes se tomaron muestras de 20 abejas por cajón, posteriormente bajo condiciones de asepsia se cortaron los abdómenes de las abejas se adiciono agua destilado estéril y se macero el contenido hasta obtener un producto homogéneo. Des este se tomó una alícuota la cual se montó sobre una cámara neubauer y se observó al microscopio donde se realizó recuento para determinar el número de esporas de *Nosema ceranae* por abeja. Para evaluar la intensidad de infestación de *Nosema ceranae*, se utilizó el siguiente criterio:

Intensidad de infección	Millones de esporas por abeja
Nula	Menos de 0.01
Muy Ligera	0.01-1
Ligera	1-5
Regular	5-10
Semisevera	10-20
Severa	Mayor de 20

Resultados:

De acuerdo a lo observado en la Tabla 12, los cajones comenzaron con intensidades de infección muy dispares entre sí, encontrándose cajones que presentaban intensidades nulas a algunos que presentaban intensidades semiseveras y severas.

Sin embargo, a medida que avanza el tratamiento a través de los meses se observa una clara tendencia a disminuir la intensidad de infección en los cajones tratados de forma drástica (2, 4 y 6), los cuales en su mayoría eran los que presentaban un mayor número de esporas por abejas al comienzo del experimento piloto en Diciembre, mientras que los cajones controles (1, 3 y 5) presentan recuentos fluctuantes, los cuales aumentan y disminuyen a medida que pasa el tiempo,

mientras que el cajón 5 presenta un aumento sostenido en la infección por *Nosema ceranae*, hasta el mes de febrero y luego disminuye.

Cabe destacar que al contrario de Varroa, en este caso durante la duración del experimento piloto no se aplicó ningún tipo de tratamiento para el control de *Nosema* en los cajones.

A pesar, que los resultados muestran un efecto beneficioso de administrar el probiótico para el control de *Nosema ceranae*, es necesario continuar con la administración por tiempos más prolongado para llegar a resultados mas concluyentes.

7) Crecimiento de población por cajón:

Se cuantificó el número de abejas por cada marco comprendido tanto en los cajones controles como tratamiento. En cada administración de probiótico, se fotografiaron los marcos de cada colmena en estudio para tener dicho registro. Estas fotografías se guardaron y luego se ordenaron para posteriormente contar la cantidad de abejas por marco.

La cuantificación se realizó de manera manual a través del software FIJI, que pertenece a ImageJ. Finalmente los resultados se analizaron y graficaron por medio del software Prism6, donde se aplicó comparaciones múltiples por columna a través de un test ANOVA de dos vías.

Resultados:

Se obtuvo un gráfico (Figura 21), en el cual se puede observar los meses de administración en el eje x y número de abejas por colmenas en el eje y. A través de este gráfico se podría sugerir una tendencia a un mayor crecimiento del número de abejas en el grupo donde se administró el probiótico con respecto al control, sin embargo, dado a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sería necesario corroborar esta información y hacerla aún más robusta, con un número mayor de colmenas y apiarios, para tener un resultado significativo con respecto a la aplicación del probiótico, y además, que fuera en un periodo más prolongado. Pese a ello, es necesario mencionar, que los cajones tratados con el probiótico demostraban un crecimiento más acelerado.

Cabe destacar, que gran parte de las colmenas dado al aumento de población, se instalaron medias alzas, para generar mayor espacio y mantener un número mayor de población de abejas, las cuales, fueron compradas durante el proyecto.

8) Producción de miel

Para evaluar este parámetro, a finales de marzo de 2019 se cosechó miel de 5 de los 6 cajones ocupados durante este pilotaje, esto debido a que el cajón 1 durante el proceso enjambre quedando con una población de abejas bastante menor al resto, por lo que, no presentaba miel al momento de la cosecha.

Para esto se cosecharon cierta cantidad de marcos por cajón, siguiendo las sugerencias del apicultor, ninguno de los cajones se cosechó por completo debido a que al llegar el otoño es necesario que las colmenas tengan miel almacenada para poder sobrevivir al proceso de invernada y no padecer de problemas nutricionales durante este tiempo.

Resultados

Los resultados presentados en la Tabla 13 se expresa como gramos de miel por marco cosechado, esto debido como en cada cajón se cosechó un número distinto de marcos, permite estandarizar y comparar los resultados entre sí.

De acuerdo a los resultados obtenidos no existen diferencias significativas en la producción de miel.

Sin embargo, este resultado puede deberse a varios factores:

- 1- Los núcleos de abejas se armaron ya avanzada la temporada de cosecha, de forma

normal la cosecha en un cajón comienza en septiembre (al comenzar la primavera), para realizarse la última recolección máximo en marzo del año siguiente. Al iniciar en diciembre la administración y armado de los núcleos se perdieron dos meses muy productivos en el sector apícola (Octubre. Noviembre), los cuales no pudieron ser cuantificados.

- 2- Al cosechar en marzo no era posible cosechar toda la miel disponible en el cajón, esto se debe que al ser marzo cercano al otoño es necesario mantener las colmenas con cierto porcentaje de miel de reserva para que sean capaces de aguantar y sobrevivir a la temporada invernal sin complicaciones nutricionales.
- 3- Fechas entre septiembre y enero son las perfectas para realizar cosechas de cajones completos sin sufrir repercusiones la viabilidad de la colmena

Debido q esto los datos fueron relativamente similares entre los cajones controles y aquellos administrados con el probiótico, para resolver este problema es necesario un ensayo ampliado que contemple administración del probióticos durante la temporada invernal y el inicio de la primavera para observar si la administración de ProBEEotic tiene algún efecto en la producción de miel.

9) Observaciones de comportamiento biológico de abejas en colmenas de experimento:

Los marcos de cada colmena iniciaron de una manera equivalente en el estudio. En su inicio todas comenzaron con 4 marcos poblados y dos nuevos. La mayoría de las colmenas tuvieron un crecimiento exponencial, agregando medias alzas a los cajones, dado al aumento de la población. Pese a aquella similitud, se observó que los cajones con tratamiento, eran abejas más activas, de crecimiento acelerado, fuerte y con aspecto más sano que las colmenas donde sólo se administró el agua con azúcar. Esto además, es fue apoyado con comentario sucesivos por parte del apicultor durante las aplicaciones, destacando que él, desconocía qué cajones era los tratados con o sin probiótico. Cabe destacar, que para obtener diferencias más significativas, es necesario realizar un estudio con mayor número de colmenas y apiarios.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	vance a la fecha
3	10	Realización de modelo de negocio	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se contrató servicio a terceros para que se hiciera un informe de modelo de negocio. El modelo de negocio es importante para saber como vender nuestro producto en un futuro y además conocer el mercado en el cual estaría inserto. El modelo de negocio se adjunta al informe final del proyecto.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se Anexa informe completo			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	12	Análisis de escalamiento del prototipo	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
No se realizó esta actividad ya que se determinó que no era necesario mandar a escalar la biomasa, si no que era mejor realizarla en el laboratorio y luego administrarla en el apiario.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	13	Producción de biomasa en biorreactor (prototipo)	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
No se realizó esta actividad ya que se determinó que no era necesario mandar a escalar la biomasa, si no que era mejor realizarla en el laboratorio y luego administrarla en el apiario.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	14	Liofilización de biomasa	0%

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.
Como no se mandó a escalar la biomasa tampoco fue necesario realizar la liofilización de ella. Administramos la cepa probiótica como biomasa viva en medio de cultivo mezclada con agua con azúcar.
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	15	Diseño de prototipo	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se contrató servicio a terceros para realizar el prototipo de probiótico, donde se diseñó la marca Probeeotic. Además de la marca, se diseñó la etiqueta del futuro producto, un prototipo en botella, cuadernos, carpetas y stickers con la marca para hacer material de difusión que se utilizará para difundir el prototipo y marca de probiótico. Asimismo, el publicista nos hizo una página en facebook de la marca del prototipo. El informe del diseño de prototipo y marca se adjunta en el informe final del proyecto.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Figura 22 y figura 23			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
4	16	Postulación patentamiento UdeC	0%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se determinó que no era necesario postular por el momento al patentamiento de la Universidad de Concepción. Como proyección se acordó realizar primero un análisis de patentamiento y luego llegar a la mejor manera de protección intelectual.			

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Nº OE			
5	17	Reuniones con compradores potenciales, inversionistas y distribuidores relacionados con la apicultura y agricultura.	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
El 25 de Abril del 2019 se realizó una actividad de finalización del proyecto dentro de la Universidad de Concepción, donde asistieron entidades importantes como la Decana de la Facultad de Ciencias Biológicas, UdeC, académicos como la Dra. Apolinaria García y el Dr. Felipe Zúñiga. Asimismo, viajó desde Santiago la Ejecutiva del proyecto María Constanza Barros y lo más importante es que asistieron apicultores de la Región del Biobío, en especial nuestro asociado Freddy Toledo (Figura 25, 26 y 27). Además, se realizó difusión del proyecto y de la charla de finalización del proyecto por medio de la prensa TVU, canal de la Universidad de Concepción (Figura 24). Por otro lado, el 31 de Mayo del 2019 se hizo un almuerzo de difusión y agradecimiento con los profesores que fueron nuestros guías científicos a lo largo del proyecto, la Dra. Apolinaria García, experta en probióticos y el Dr. Felipe Zúñiga, experto en biología molecular y celular.			
Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)			
Figura 24, 25, 26, 27 y 28.			

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
3	12	Análisis antioxidante de miel de Nonguén	100%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Se externalizó un servicio a tercero a la empresa Functional Life, con el objetivo de evaluar propiedades de la miel del apiario Valle Nonguén, de nuestro apicultor asociado. Específicamente, se evaluó el contenido de polifenoles y antioxidantes respecto a otras muestras control, donde se determinó que la miel del apiario Nonguén es muy rica en polifenoles totales (22,7) y que presenta un alto contenido de antioxidantes (21,4 ET/g) en relación a otros apiarios evaluados, por lo que guarda un gran potencial, donde en			

conjunto con la aplicación de probióticos a las colmenas, podría presentar características únicas y especiales, lo que podrían darle un gran valor agregado para su comercialización.

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Figura 29 y Tabla 14. (Se anexa informe completo)

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Avance a la fecha
5	18	Difusión del prototipo de probiótico en ferias apícolas y agrícolas.	50%
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Si bien, no se alcanzó a difundir el prototipo en ferias agrícolas, si se logró difundir el prototipo en el sector apícola ya que en la charla de finalización del proyecto fueron aproximadamente 20 apicultores, la mayoría pertenecientes a APICONCE. Además a través de la difusión en la prensa se logró realizar un contacto importante con la Municipalidad del Alto del Biobio, la cual nos contacta con aproximadamente con 200 apicultores futuros compradores del producto.			
Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.			
Figura 24, 25, 26 y 27			

8. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS

Especificar los cambios y/o problemas en el desarrollo del proyecto durante el período informado.

Describir cambios y/o problemas	Consecuencias (positivas o negativas), para el cumplimiento del objetivo general y/o específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y/o problemas
Para medir la estimulación del sistema inmune en abejas se cambió la técnica, esto quiere decir que en vez de medir a través de ensayo de ELISA por medio de anticuerpos específicos, se midió a través de qPCR.	Las consecuencias positivas fueron que a través de esta técnica se midieron muchas moléculas al mismo tiempo, que al hacerse la técnica de ELISA no hubiéramos podido hacer. Además qPCR es una técnica en tiempo real y que se puede cuantificar. La consecuencias negativas fueron que se debió invertir mucho dinero en eso, pero la técnica dio buenos resultados.	Se realizaron los ensayos a través de otra técnica llamada qPCR, que tiene la ventaja de ser una técnica que permite entregar datos en tiempo real y además, cuantificables.
Se realizó un ensayo <i>ex situ</i> en el laboratorio preliminar para determinar si efectivamente las cepas producían una estimulación del sistema inmune y además para seleccionar la mejor de las 9 cepas.	Las consecuencias positivas fueron que se obtuvieron muy buenos resultados, demostrándose que la mayoría de las cepas seleccionadas estimulaban de una u otra manera el sistema inmune en abejas, pero una sola fue la que dio el mejor resultado, por lo tanto seleccionamos a la mejor.	Antes de generar la biomasa que será administrada a las abejas en los apiarios, se realizó un ensayo <i>ex situ</i> en condiciones de laboratorio, donde, se determinó y cuantificó la liberación de moléculas del sistema inmune por medio de la técnica de qPCR.
Se eliminó la actividad de determinar la actividad hemolítica, ya que, las abejas tienen hemolinfa y no sangre.	Esta actividad no tiene mucha importancia para cumplir el objetivo general del proyecto ya que los otros ensayos han salido bien durante el transcurso del proyecto y nos han dado la oportunidad de seleccionar a una cepa con excelentes propiedades probióticas e inmunomoduladoras para abejas.	No se realizó esta actividad, pero más adelante se espera reemplazar por un ensayo acorde a las características de la hemolinfa de las abejas.
Se eliminó las actividades y	No tuvo ninguna consecuencia ni positiva ni	Se administró la cepa bacteriana directa desde el cultivo en el apiario

resultados esperados relacionados al escalamiento y formulación de la biomasa.	negativa para el proyecto, ya que nos dimos cuenta que el probiótico se podía administrar sin tener que liofilizar la biomasa de bacterias, si no que simplemente se cultivaban las bacterias y luego el cultivo vivo se administró en el apiario del apicultor.	del asociado.
Después de varias reuniones, se llegó a la conclusión de que no se postularía al patentamiento de la UdeC.	No tiene consecuencias negativas ya que aún no es necesario proteger la tecnología.	
Se cambió el servicio de secuenciación de la cepa por un servicio de análisis de componentes antioxidantes de la miel del asociado Don Freddy	Lo único que cambió para el proyecto es no saber qué cepa específica de Lactobacillus es la que probamos en los apiarios. Pero si se pudo determinar la composición y propiedades de la miel.	Para solucionar el problema simplemente se mandó a hacer otro servicio a terceros para determinar las propiedades de la miel del asociado Don Freddy.

9. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

9.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas en el período del informe

1. Se medirá la liberación de moléculas del sistema inmune de abejas cuando se administra el probiótico a las abejas, además se medirá cuando se administra el probiótico y luego se exponen las abejas a Varroa. Luego a través de estos resultados se seleccionarán las mejores BAL.
2. se realizará una cotización y análisis de escalamiento del polvo probiótico junto con la ayuda de Innbio, plataforma biotecnológica de la Universidad de Concepción.
3. Se producirá la biomasa del probiótico en un biorreactor lo cual nos servirá para producir el prototipo a mayor escala.
4. Se realizará la liofilización de la biomasa del probiótico para obtener el polvo de prototipo probiótico para abejas.
5. Se realizará un diseño del prototipo a través de la ayuda de IncubaUdeC.
6. Una vez obtenido el prototipo de producto probiótico se procederá a postular al proceso de patentamiento de la Universidad de Concepción.
7. Se desarrollarán jornadas con potenciales compradores, inversionistas y distribuidores posibles del producto que estén relacionados con la industria apícola y agrícola, con el fin de facilitar las ventas a futuro. Todo esto será realizado con la ayuda de IncubaUdeC, InnBio y FIA.
8. Finalmente se gestionará la participación en ferias de difusión de productos apícolas, agrícolas y veterinarios, con el fin de hacer conocer nuestro prototipo y distribuirlo a posibles compradores. La idea es que se entregue una muestra gratis a diferentes apícolas o agrícolas, con el fin de que puedan probarlos en sus apiarios y después entregarnos una retroalimentación.

9.2 Actividades programadas y no realizadas en el período del informe

1. Se producirá la biomasa del probiótico en un biorreactor lo cual nos servirá para producir el prototipo a mayor escala.
2. Se realizará la liofilización de la biomasa del probiótico para obtener el polvo de prototipo probiótico para abejas.
3. Una vez obtenido el prototipo de producto probiótico se procederá a postular al proceso de patentamiento de la Universidad de Concepción.
4. Finalmente se gestionará la participación en ferias de difusión de productos apícolas, agrícolas y veterinarios, con el fin de hacer conocer nuestro prototipo y distribuirlo a posibles compradores. La idea es que se entregue una muestra gratis a diferentes apícolas o agrícolas, con el fin de que puedan probarlos en sus apiarios y después entregarnos una retroalimentación.

9.3 Actividades programadas para otros períodos y realizadas en el período del informe

--

9.4 Actividades no programadas y realizadas en el período del informe

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Analizar los componentes antioxidantes de la miel obtenida en el apiario del asociado Freddy Toledo.2. Realización de modelo de negocio. |
|--|

10. CAMBIOS EN EL ENTORNO

Indique si han existido cambios en el entorno que afecten el proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros

--

11. DIFUSIÓN

11.1. Describa las actividades de difusión programadas durante el período:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Documentación Generada
25 de Abril 2019	Universidad de Concepción	Actividad de finalización de proyecto	60 personas	Fotografías
24 de abril 2019	Entrevista en prensa canal TVU, Universidad de Concepción	Difusión de prototipo y de actividad de finalización de proyecto	Extensivo	Fotografías y nota de prensa
31 de Mayo 2019	Fina Estampa, Concepción	Almuerzo con Doctores de la Universidad de Concepción	6 personas	Fotografías

12. CONCLUSIONES

12.

12.1. **¿Considera que los resultados obtenidos hasta la fecha permitirán alcanzar el objetivo general del proyecto?**

Durante todos los meses desde que llegó el dinero del proyecto se ha trabajado semana a semana con la intención de obtener los resultados, y como se observa en los anexos se puede verificar el arduo trabajo que se ha realizado. En general hemos desarrollado gran parte de lo planificado y se han obtenido resultados muy favorables para nuestro proyecto. Independiente de los problemas que hemos tenido al desarrollar nuestro trabajo, estamos bien dentro de los plazos y obtendremos los resultados esperados en el plazo dado. Hasta la fecha ya tenemos una cepa seleccionada, la A14.2, que tiene la capacidad de estimular el sistema inmune en abejas vivas y además posee las mejores propiedades probióticas y tecnológicas lo que la hacen altamente escalable en un futuro. Además a través de los resultados mostrados, se puede sugerir que la cepa A14.2 tiene la capacidad de proteger a las abejas de patógenos importantes como Varroa y Nosema. Dentro de los parámetros biológicos se observó siempre una excelente salud de las abejas y producción de miel. Por último, por medio de los fondos entregados por FIA se pudo hacer el modelo de negocio, diseño del prototipo y análisis de componentes importantes de la miel.

12.2. **¿Considera que el objetivo general del proyecto se cumplirá en los plazos establecidos en el plan operativo?**

A través de los resultados obtenidos y mencionados en los anexos, si se considera que el objetivo general del proyecto se cumplirá en los plazos establecidos hasta el momento. Hemos tenido problemas pero ninguno significativamente mayor como para impedir que se desarrolle de manera normal el proyecto. Lo único que falta es administrar la cepa seleccionada en los apiarios, pero si se realiza durante los meses que quedan del proyecto se podría obtener los resultados planificados en el proyecto.

12.3. **¿Ha tenido dificultades o inconvenientes en el desarrollo del proyecto?**

Si hemos tenido dificultades e inconvenientes, como se describe más arriba, pero en general solo son cosas que están fuera de nuestro alcance y son completamente solucionables. El inconveniente que se presentó en esta segunda etapa del proyecto fue que no vendían anticuerpos de abejas, pero se solucionó comprando partidores de moléculas del sistema inmune de abejas y se procedió a realizar qPCR para obtener los parámetros necesarios para realizar los objetivos del proyecto.

12.4. ¿Cómo ha sido el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

El equipo técnico dentro del proyecto ha funcionado sumamente bien, todas las personas involucradas han desarrollado las actividades de manera eficiente y productiva. Con respecto al asociado, ha sido un poco más difícil dar a entender los gastos pecuniarios del proyecto, pero con respecto a la facilidad de las muestras de abejas y el acceso a los apiarios no ha puesto ningún tipo de problema. Siempre ha tenido muy buena voluntad y disposición de su espacio físico.

12.5. En relación a lo trabajado en el período informado, ¿tiene alguna recomendación para el desarrollo futuro del proyecto?

La única recomendación para el desarrollo del futuro proyecto sería seguir trabajando como se ha hecho hasta el momento

12.6. Mencione otros aspectos que considere relevante informar, (si los hubiere).

13. ANEXOS

Realice y enumere una lista de documentos adjuntados como anexos.

ANEXO 1: Presentación curso de verano Universidad de Concepción.

ANEXO 2: Caja de Flujo (Excel).

ANEXO 3: Estudio de Factibilidad Legal, Económica y Financiera.

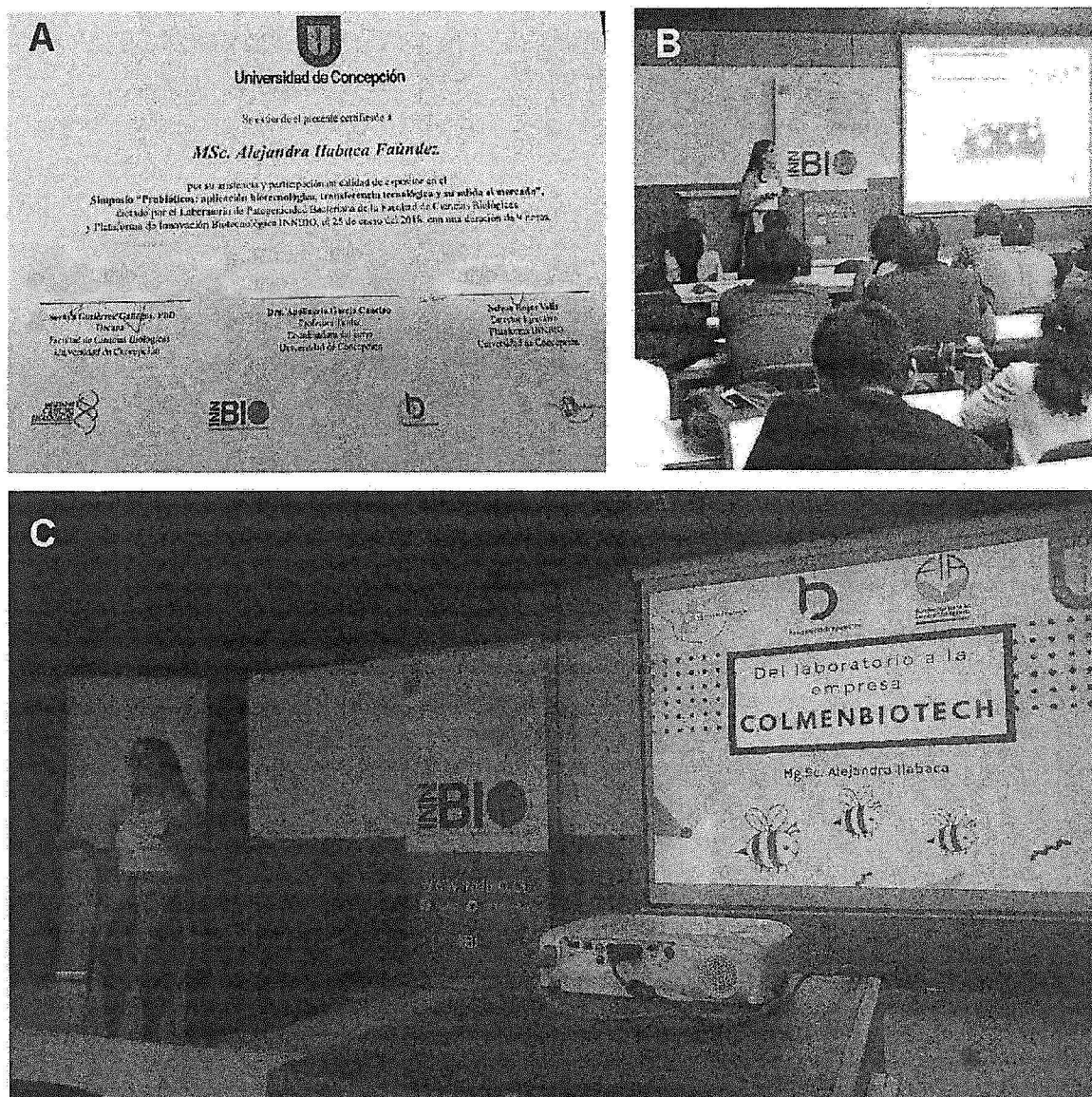


Figura 1: Actividad de difusión Simposio Satélite en Universidad de Concepción. A) Certificado de participación de la actividad, B y C) Alejandra Ilabaca, ejecutora del proyecto, realizando charla sobre probiótico para abejas y proyecto adjudicado FIA.

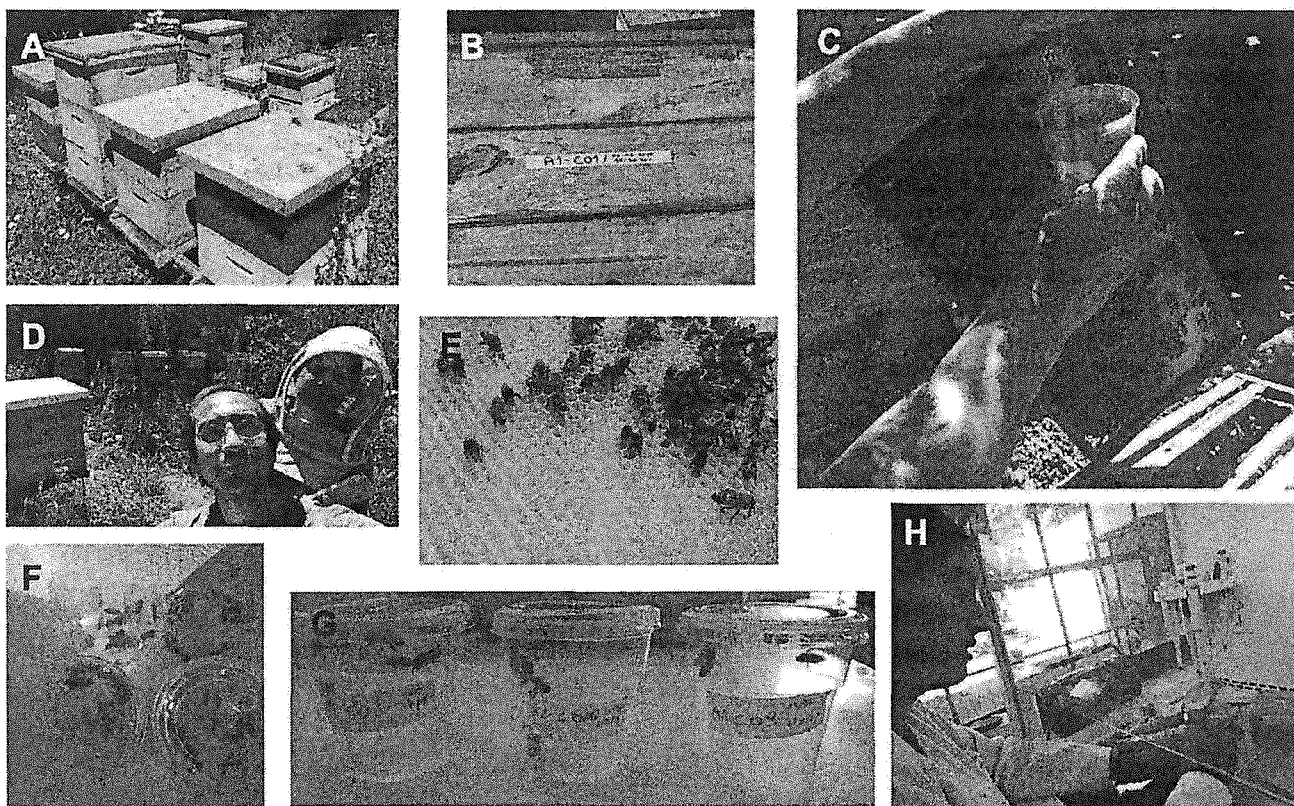


Figura 2: Muestreo 1 en Apiario Nonguén realizado el 01 de febrero del 2018. A) Colmenas del Apiario, B) Cajón marcado para identificar dónde se obtenían muestras, D) Jorge Rocha junto a Romina Carvajal realizando muestreo, E) Abejas en su respectiva colmena, F) Frascos plásticos donde se almacenan abejas de cada colmena muestreada, G) Frascos plásticos en Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana y H) Fabiola Silva realizando aislamiento de bacterias ácido lácticas de abejas.

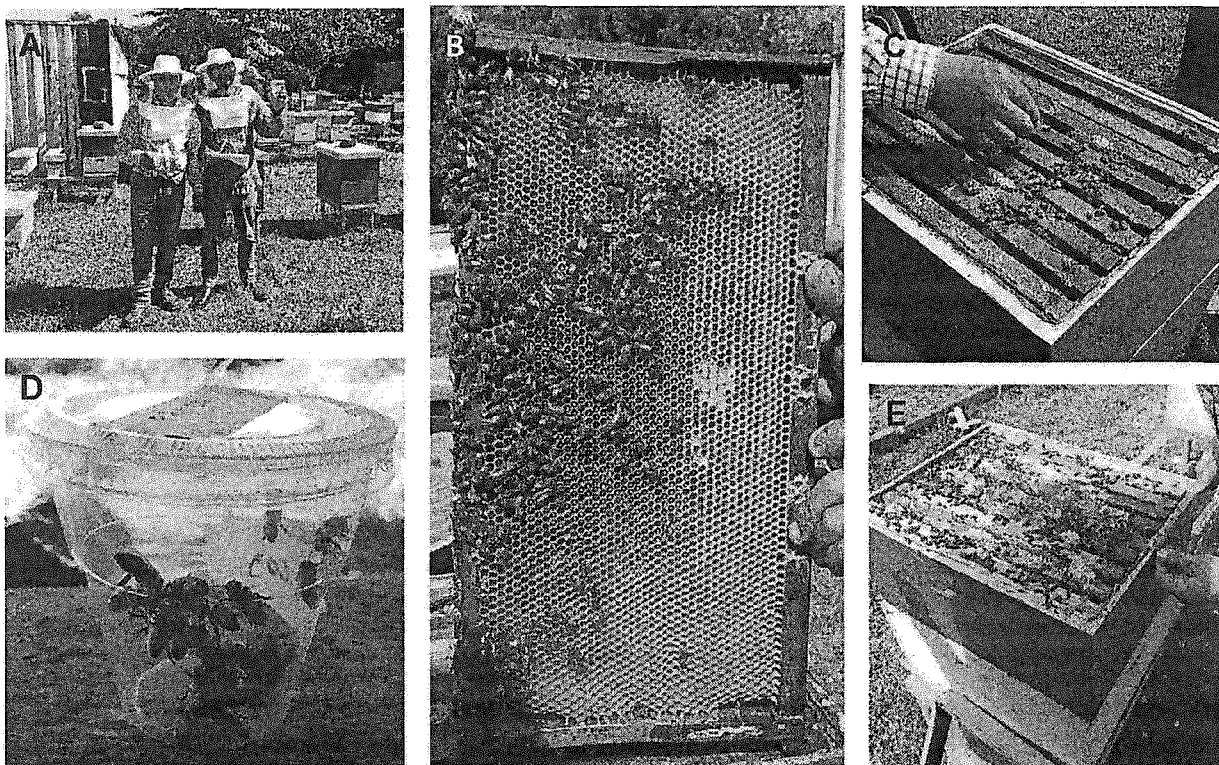


Figura 3: Muestreo 2 en Apiario Parque del Río Zañartu realizado el 23 de Marzo del 2018. A) Fotografía del apicultor asociado Freddy Toledo (Izquierda) y Jorge Rocha (parte del equipo técnico) en el apiario, B) Cajón de colmena con abejas para muestreo, C) y E) Colmena con abejas, D) Frasco plástico donde se almacenan las abejas para trasladarlas al Laboratorio.

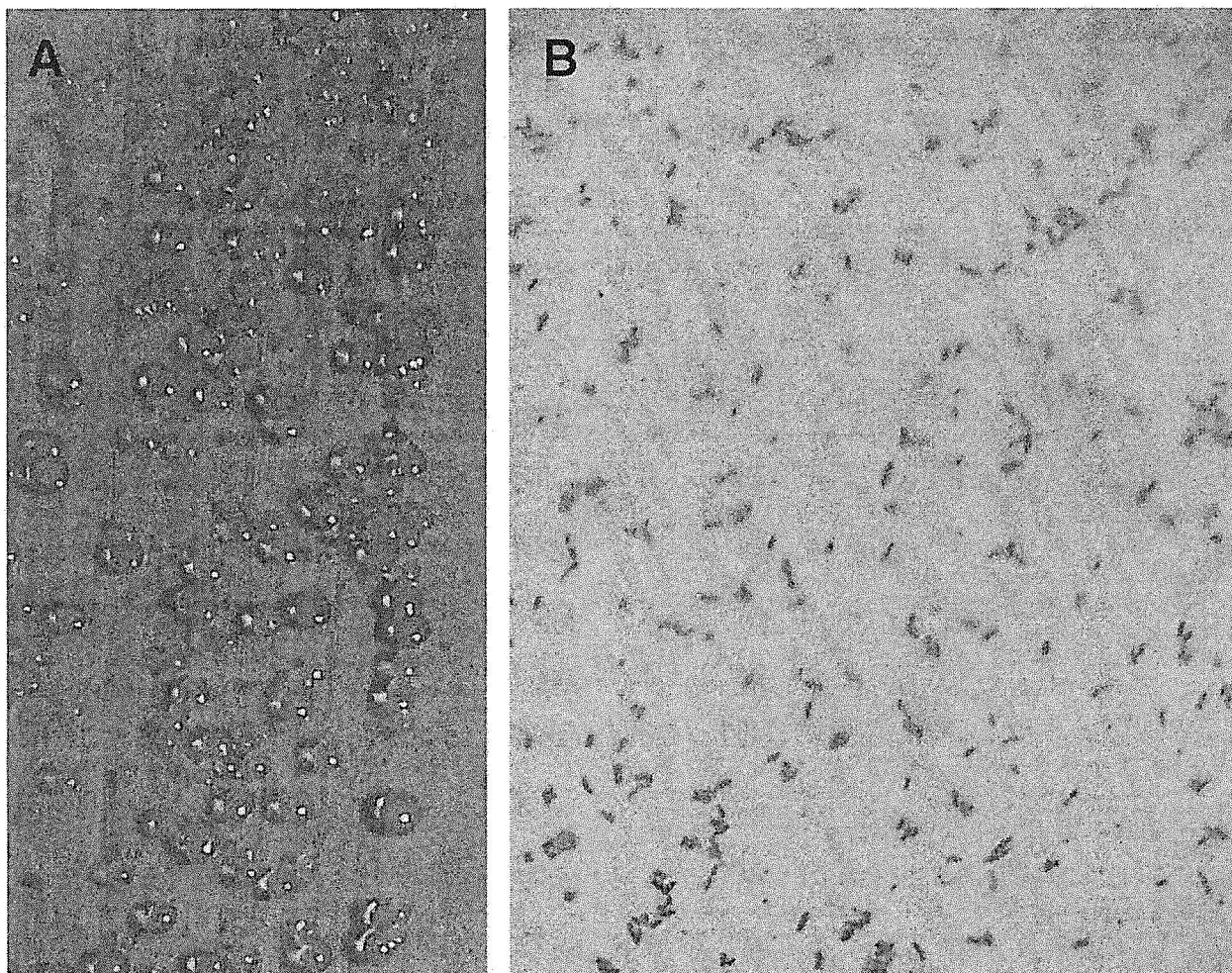


Figura 4: Aislamiento de bacterias ácido lácticas. A) Crecimiento macroscópico de colonia bacteriana ácido láctica. B) Fotografía de microscopio óptico realizada con tinción Gram de la misma cepa. Presentan una morfología bacilar, Gram positiva sin agrupación.

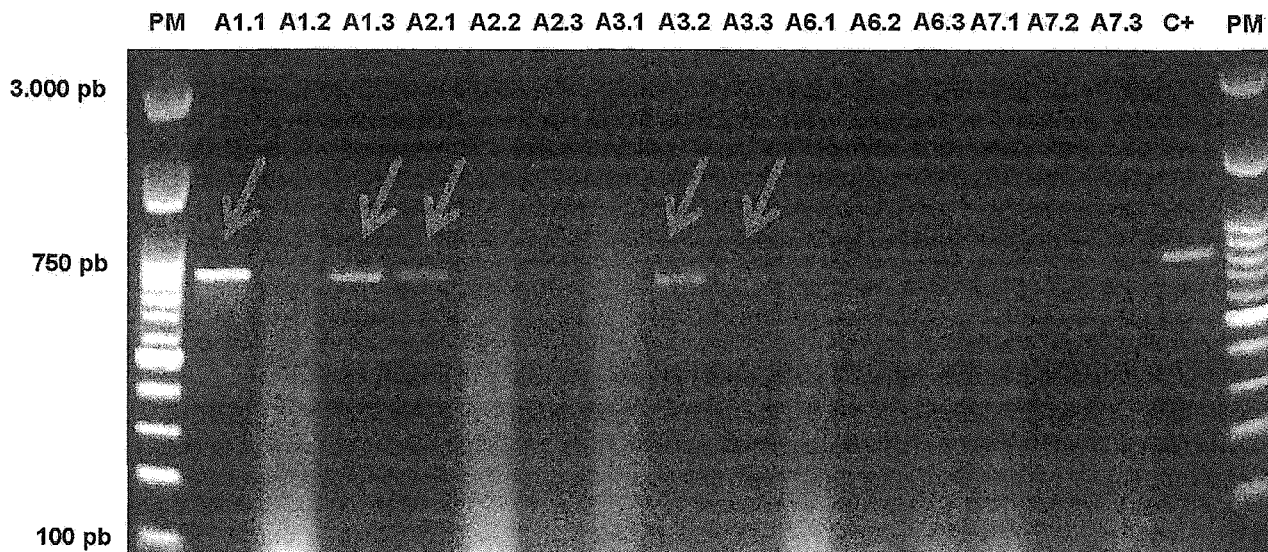


Figura 5: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), A1.1, A1.2, A1.3, A2.1, A2.2, A2.3, A3.1, A3.2, A3.3, A6.1, A6.2, A6.3, A7.1, A7.2, A7.3, control positivo (C+) y peso molecular (PM).

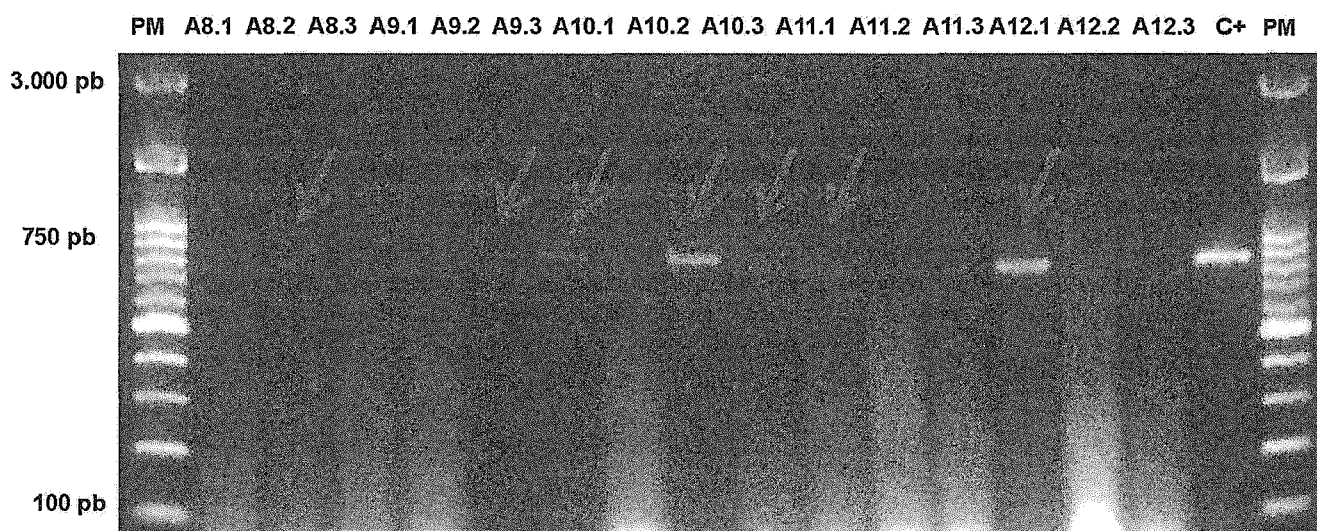


Figura 6: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), A8.1, A8.2, A8.3, A9.1, A9.2, A9.3, A10.1, A10.2, A10.3, A11.1, A11.2, A11.3, A12.1, A12.2, A12.3, control positivo (C+) y peso molecular (PM).

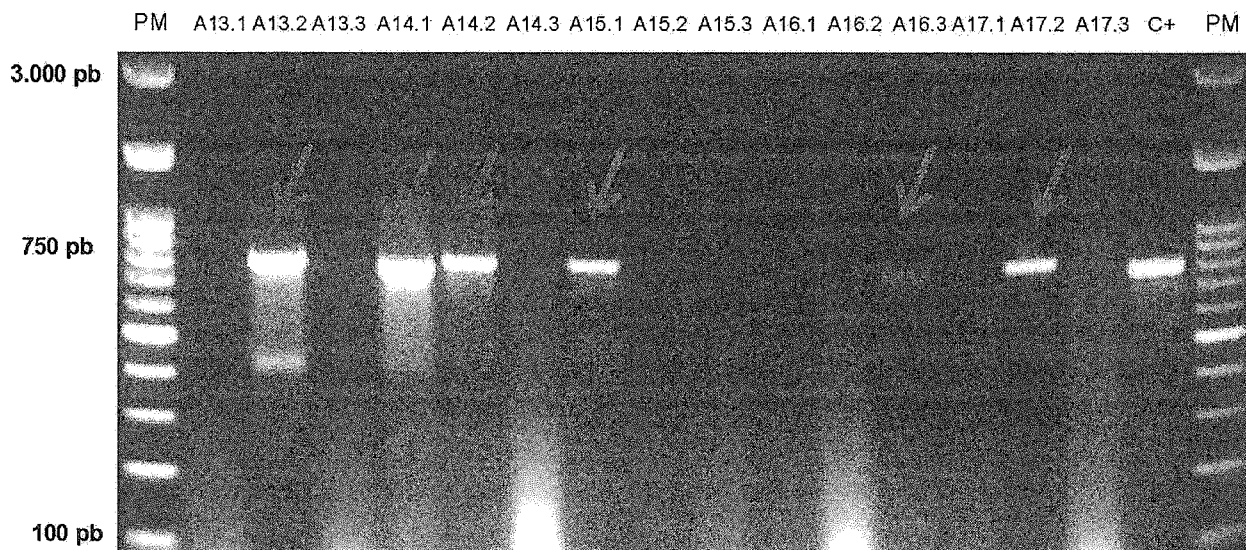


Figura 7: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), A13.1, A13.2, A13.3, A14.1, A14.2, A14.3, A15.1, A15.2, A15.3, A16.1, A16.2, A16.3, A17.1, A17.2, A17.3, control positivo (C+) y peso molecular (PM).

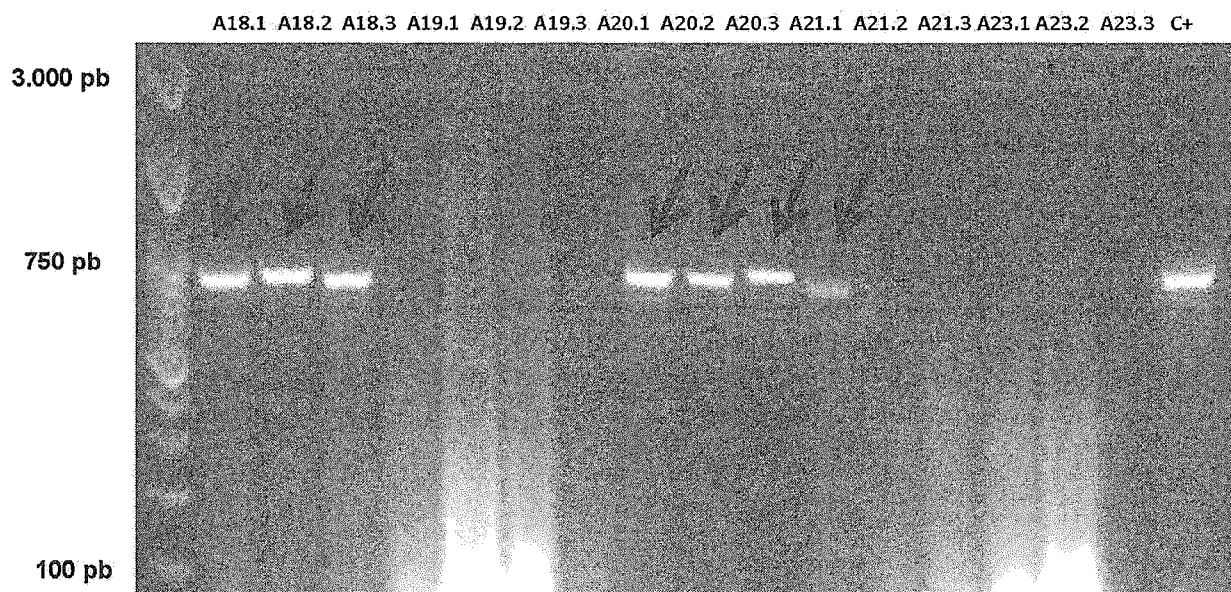


Imagen 8: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), A18.1, A18.2, A18.3, A19.1, A19.2, A19.3, A20.1, A20.2, A20.3, A21.1, A21.2, A21.3, A23.1, A23.2, A23.3, control positivo (C+) y peso molecular (PM).

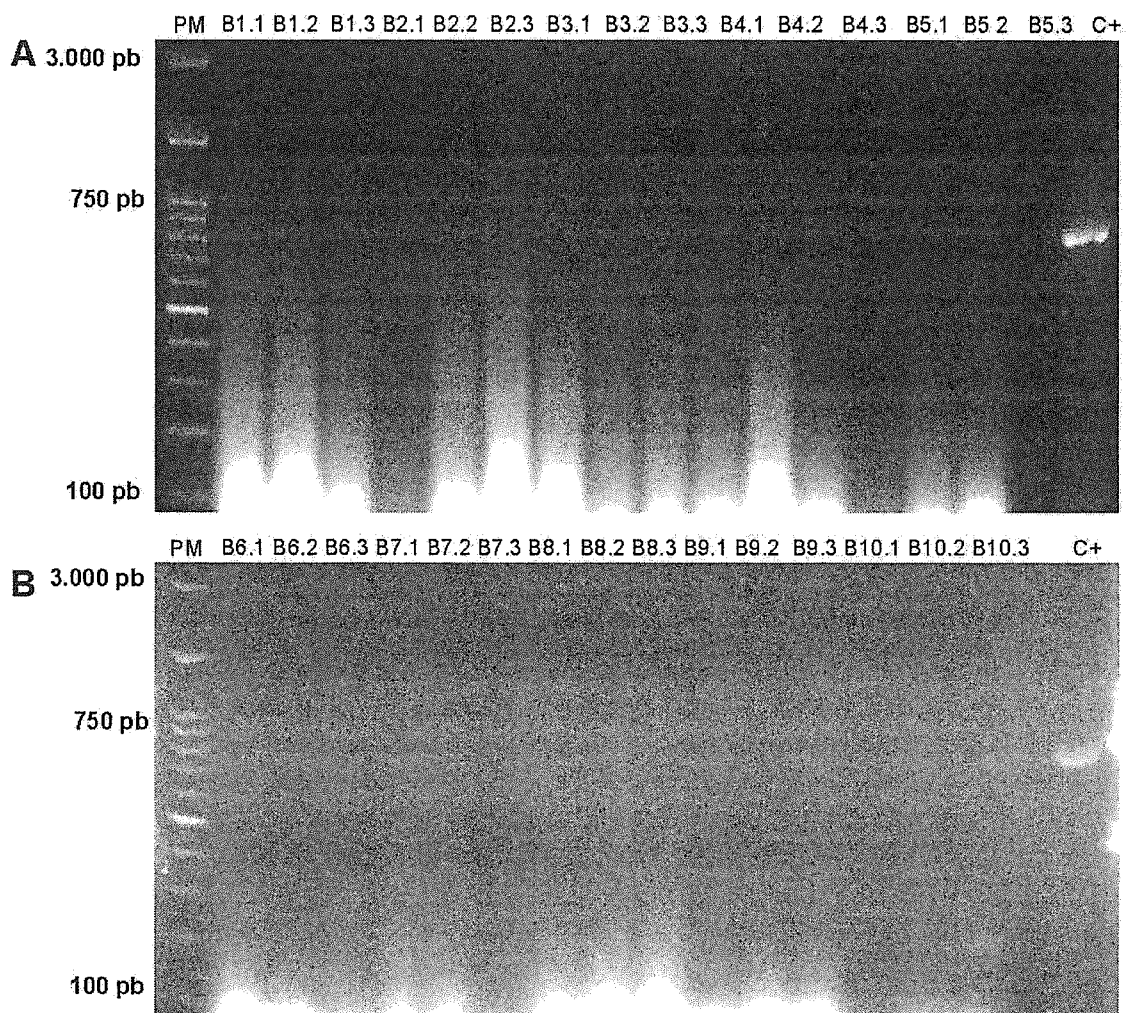


Figura 9: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Como se observa, para las muestras B que representaban una mezcla de bacterias no se detectó ninguna cepa de *Lactobacillus*.

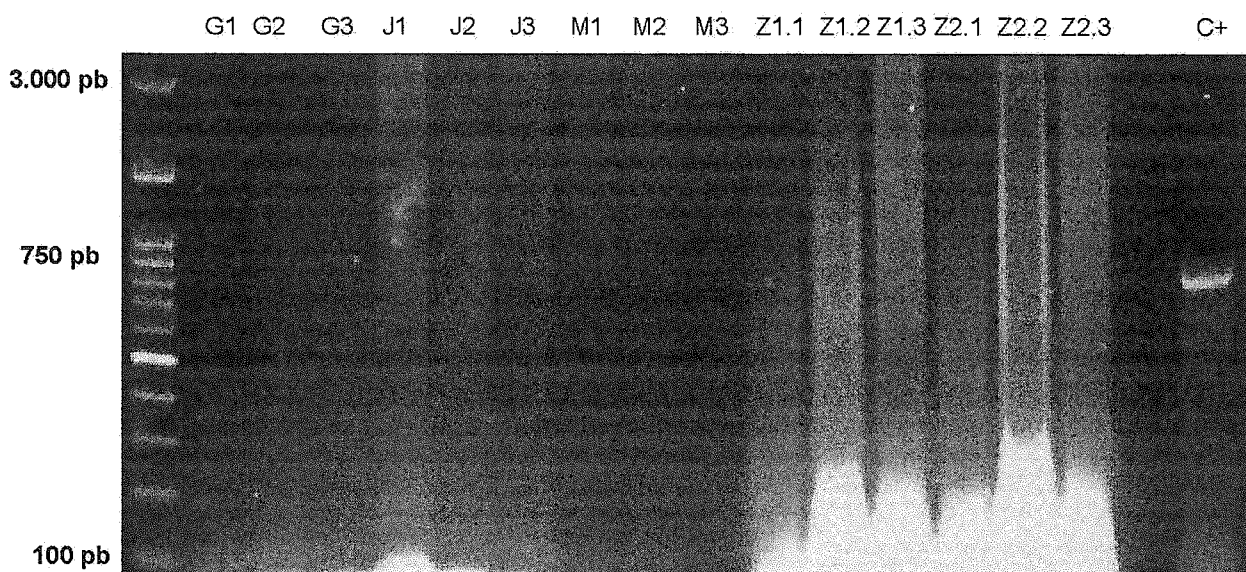


Figura 10: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), G1, G2, G3, J1, J2, J3, M1, M2, M3, Z1.1, Z1.2, Z1.3, Z2.1, Z2.2, Z2.3 y Control positivo (C+).

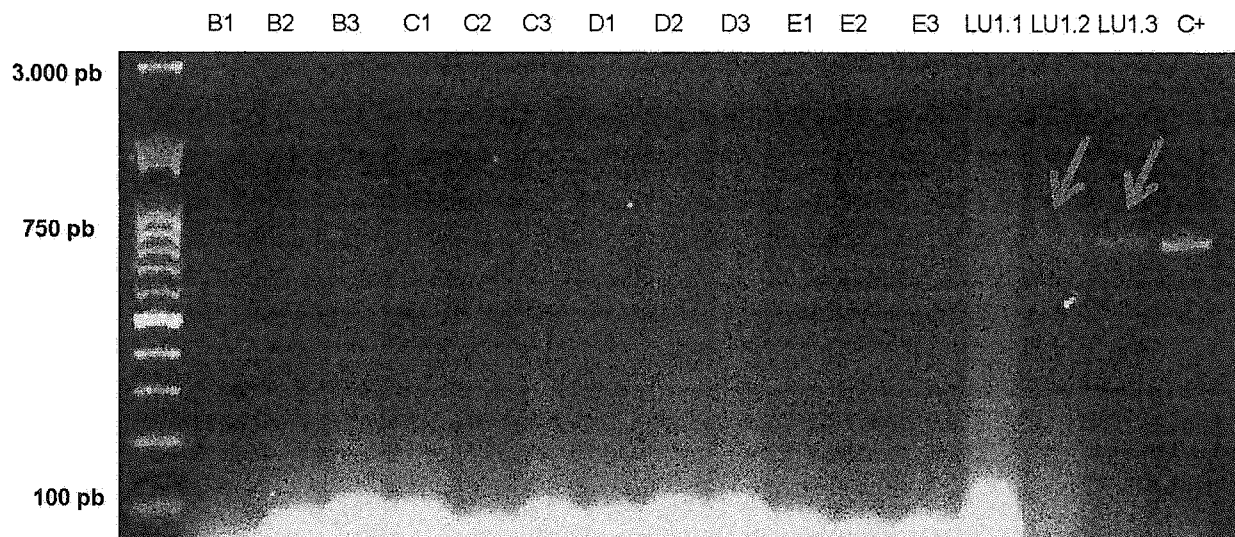
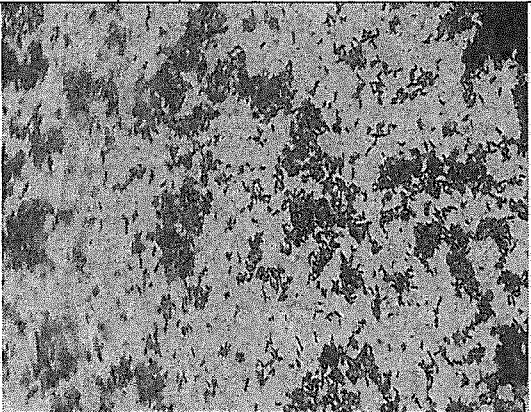
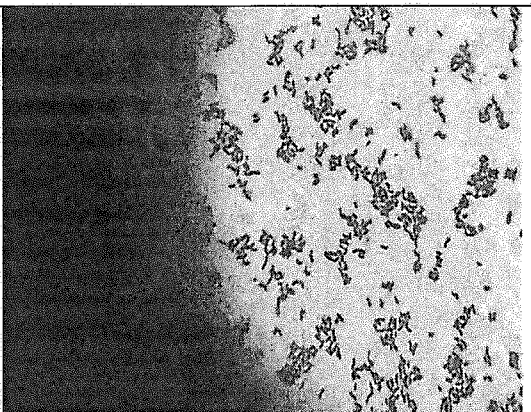
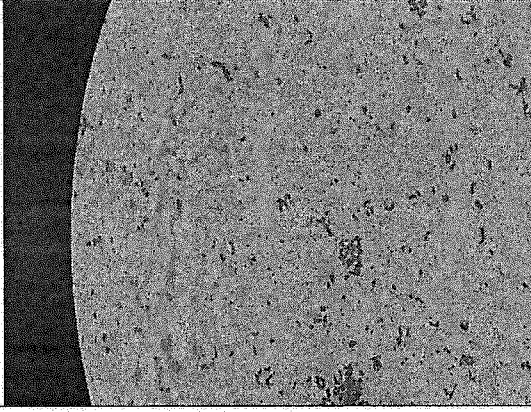
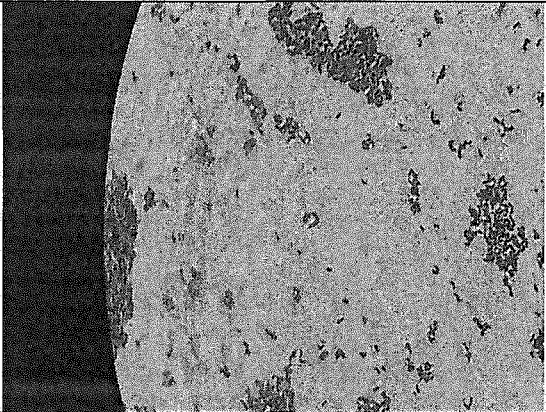
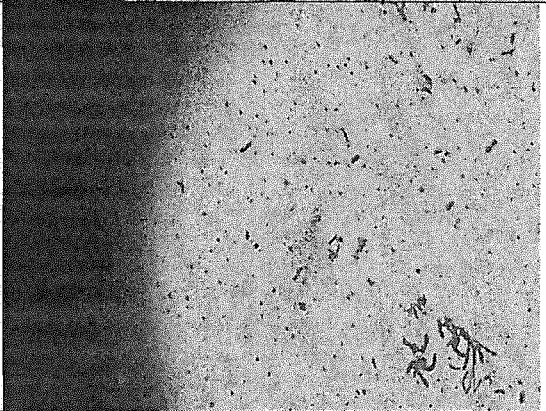
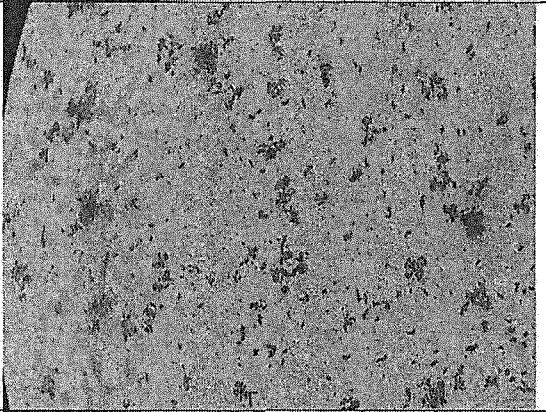
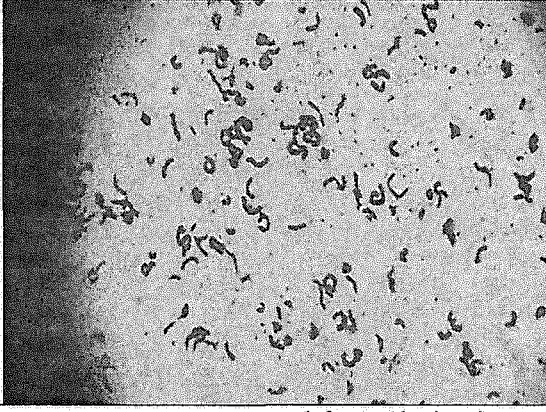
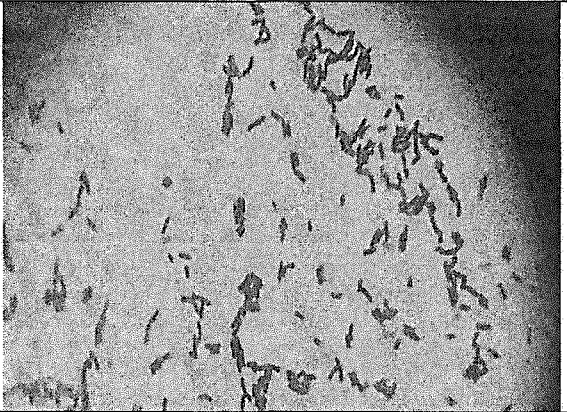
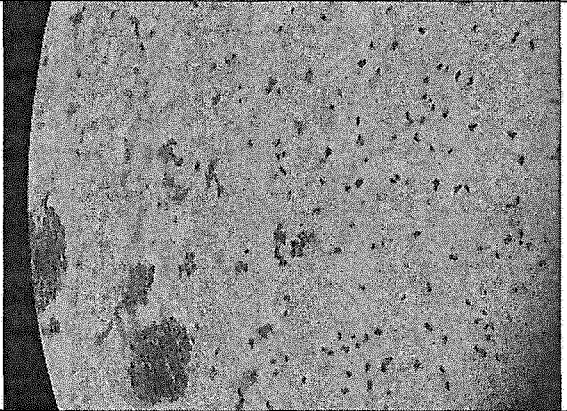
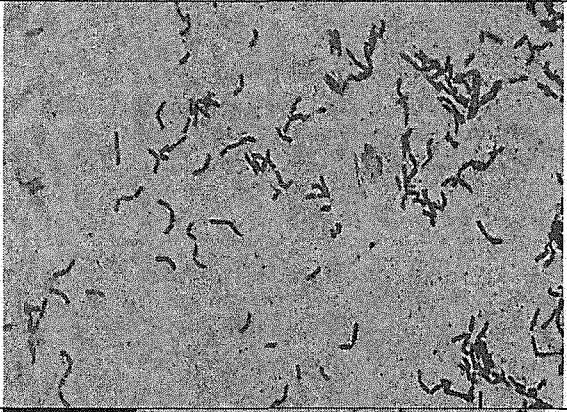
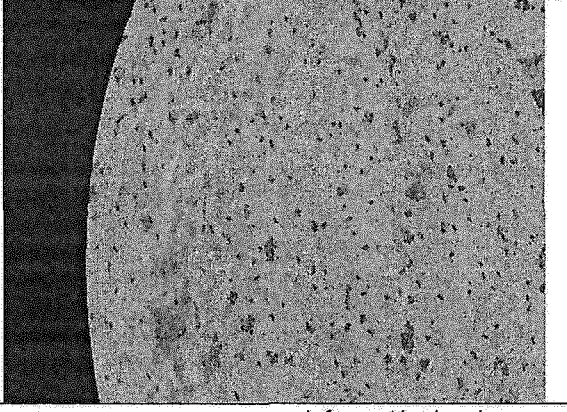


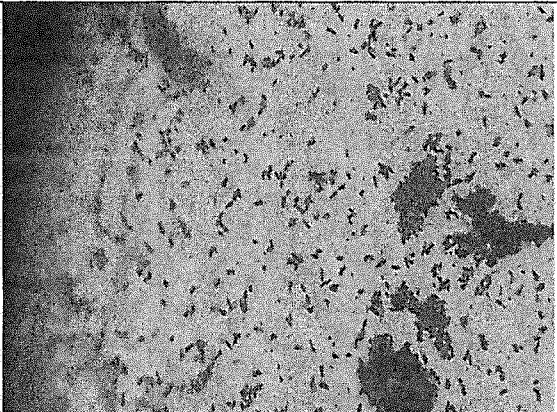
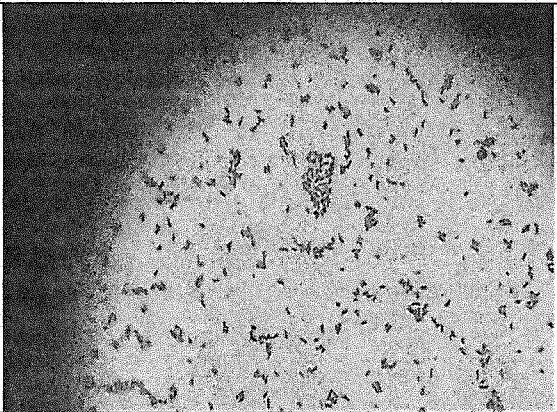
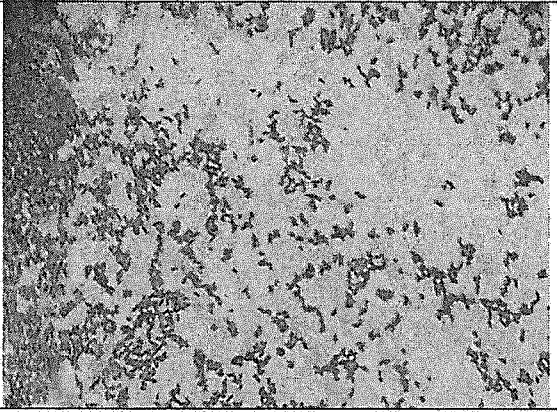
Figura 11: Detección de cepas *Lactobacillus* a partir de colonias bacterianas, con el partidor LgG. Carriles: Peso molecular (PM), B1, B2, B3, C1, C2, C3, D1, D2, D3, E1, E2, E3, LU1.1, LU1.2, LU1.3 y Control positivo (C+).

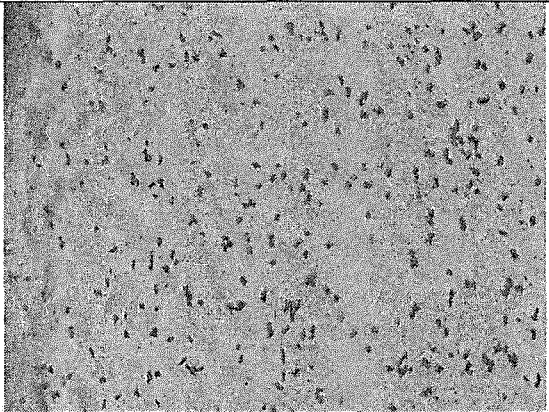
Tabla 1: Resumen de cepas que fueron positivas para el género *Lactobacillus* a través de PCR.

Código cepa	Muestreo	Cajón de Origen	Fotografías de tinciones Gram en Microscopio óptico
A1.1	1	C02	
A3.2	1	C01	
A6.2	1	C09	
A7.2	1	C02	
A8.2	1	C06	
A10.2	1	C04	

A10.3	1	C04	
A11.1	1	C04	
A12.1	1	C04	
A13.2	1	C04	

A14.2	1	C05	
A16.3	1	C09	
A18.1	1	C09	
A18.2	1	C09	

A18.3	1	C09	
A20.2	1	C09	
A20.3	1	C09	
A21.1	1	C09	

A21.2	1	C09	
-------	---	-----	--

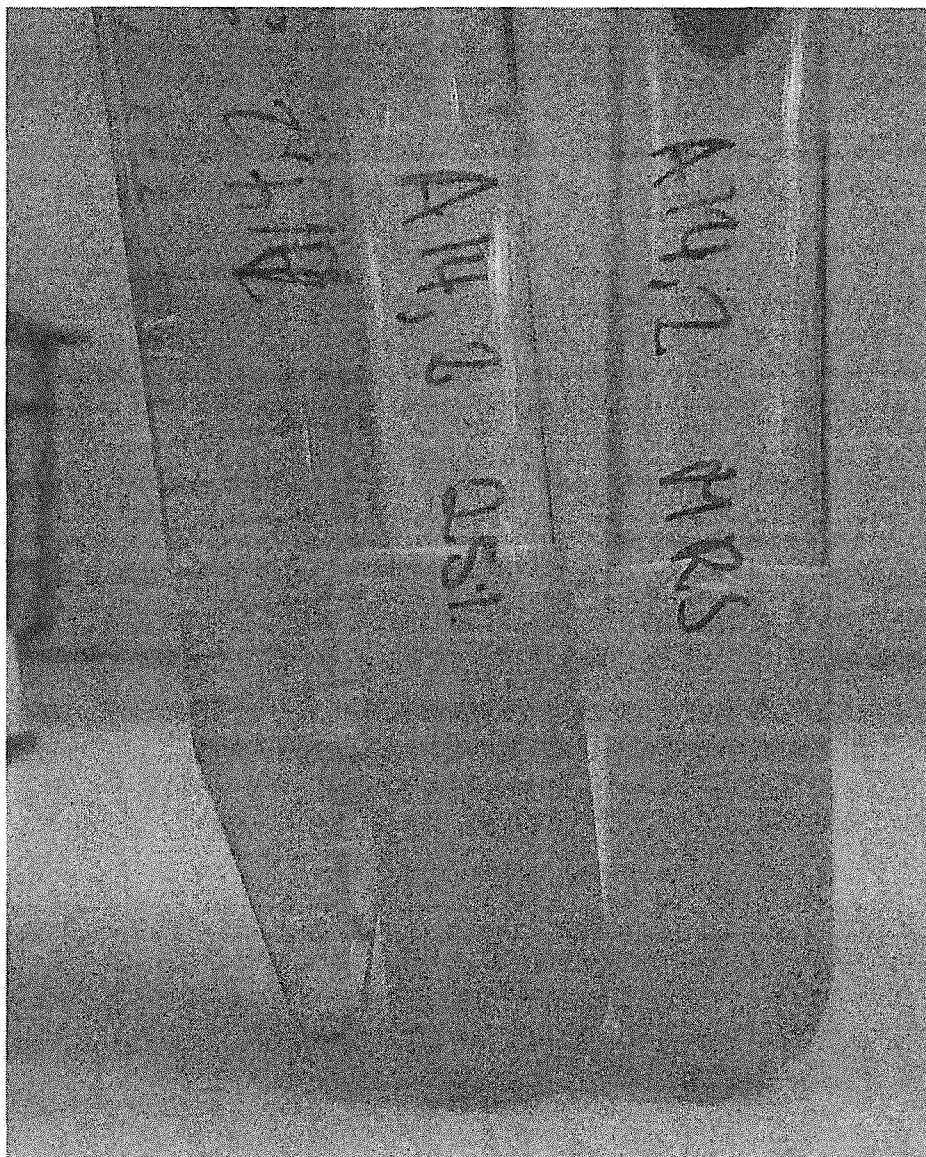


Figura 12: Ensayo con 25% y 50% de azúcar. Como se puede observar, se ve turbidez en ambos medios suplementados (25 y 50% de azúcar, tubos de la derecha), en cambio en el control donde no se inoculó ninguna bacteria no se observa turbidez (tubo de la izquierda).

Tabla 2: Cantidad de colmenas de abejas en Chile desde el 2016 al 2025.

Año	Cantidad de colmenas de abejas	Año	Cantidad de colmenas de abejas
2016	499.278	2021	540.404
2017	507.503	2022	548.629
2018	515.728	2023	556.854
2019	523.953	2024	565.079
2020	532.178	2025	573.304

Fuente: Elaboración propia en base a datos de ODEPA y Servicio Nacional de Aduanas

Tabla 3: Cantidad de gramos de probiótico para cubrir la totalidad del mercado desde el 2019 al 2025.

Año	Cantidad de probiótico (g)	Año	Cantidad de probiótico (g)
2019	4.191.625	2023	4.454.831
2020	4.257.427	2024	4.520.633
2021	4.323.228	2025	4.586.434
2022	4.389.030	-	-

Fuente: Elaboración propia en base a datos de ODEPA y Servicio Nacional de Aduanas

Tabla 4: Cantidad de colmenas de abejas con la utilización del probiótico desde el 2019 al 2025

Año	Cantidad de colmenas de abejas	Año	Cantidad de colmenas de abejas
2019	575.526	2023	617.711
2020	589.731	2024	626.850
2021	599.377	2025	635.989
2022	608.566	-	-

Fuente: Elaboración propia en base a datos de ODEPA y Servicio Nacional de Aduanas

Tabla 5: Ensayo de concentración de azúcar para las cepas positivas para PCR (22 en total), donde se ocupó como control el caldo MRS solo, y para las pruebas se utilizó caldo MRS suplementado con 25% y 50% de azúcar. (-): no hay crecimiento, (+): bajo crecimiento, (++) : crecimiento, (+++): alto crecimiento.

N°	CEPA	MRS	25%	50%
1	LU2.3	-	++	++
2	A20.3	+	+	+
3	A21.1	+	++	++
4	A6.2	+	++	++
5	A10.3	+	++	++
6	A8.2	+	++	++
7	A20.2	+	+	++
8	LU1.2	+	++	++
9	A18.2	+	++	++
10	A7.2	+	++	++
11	A12.1	+	+++	+++
12	A3.2	+	+	+
13	A21.2	+	++	++
14	A11.1	+++	++	++
15	A16.3	+	+++	++
16	A10.2	+	+++	++
17	LU1.3	+	+++	+++
18	A13.2	+	+++	++
19	A14.2	++++	+++	++
20	A1.1	+	++	++
21	A18.3	+	++	+
22	A18.1	+	++	+

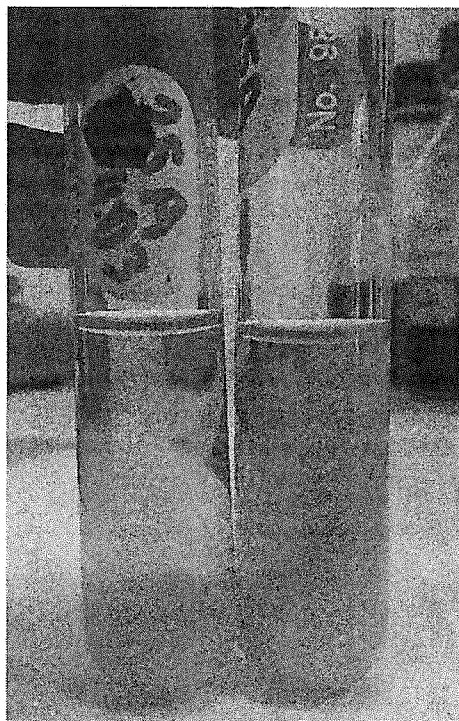


Figura 13: Crecimiento de cepas en medio MRS con pH 4.03 y 6.9.

Tabla 5: Ensayo de sobrevivencia para las cepas positivas del ensayo con azúcar (16 en total), se evaluó pH 4.03 y pH 6.9. (-): no hay crecimiento, (+): bajo crecimiento, (++) : crecimiento, (+++): alto crecimiento, (++++): muy alto crecimiento.

Nº	CEPA	pH 4.03	pH 6.9
1	A7.2	++	+++
2	LU1.2	+	+++
3	A21.1	+	+++
4	LU2.3	+++	+++
5	A16.3	+++	+++
6	A11.1	+++	+++
7	A14.2	++++	+++++
8	A1.1	-	+++
9	A8.2	++	+++
10	A20.2	+	+++
11	A12.1	+	+++
12	A21.2	++	+++
13	A10.2	+++	+++
14	LU1.3	-	+++
15	A6.2	-	+
16	A10.3	+++	+++

Tabla 6: Perfil de susceptibilidad antibiótica de cepas de *Lactobacillus* de origen gastrointestinal de abejas

Antibiótico	(µg)	Cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas desde abejas								
		A7.2	A11.2	A14.2	LU2.3	A10.2	A16.3	A10.3	A21.2	UCO-25A (control)
Cefotaxima	30	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	S
Ampicilina	10	SS	ND	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Gentamicina	10	MS	MS	MS	MS	S	MS	S	MS	S
Cloranfenicol	30	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Kanamicina	30	MS	MS	R	R	MS	R	MS	MS	R
Amikacina	30	S	MS	MS	MS	S	MS	S	MS	MS
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25	R	MS	R	MS	R	MS	R	MS	MS
Ciprofloxacina	5	S	S	S	S	S	S	MS	MS	SS
Colistina	10	MS	MS	R	MS	MS	MS	MS	MS	R
Rifampicina	5	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Vancomicina	30	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Neomicina	30	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Estreptomina	10	SS	S	S	S	SS	SS	SS	SS	SS
Eritomicina	15	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Claritromicina	15	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS
Penicilina	10	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS	SS

Criterio de Giorgieva y col.(2008). Susceptibilidad es expresada como: R (resistente)- sin inhibición; MS (medianamente sensible)- zona de inhibición entre 7-16 mm; S (sensible)-16-25 mm; SS (altamente sensible)- más de 25 mm; ND – no determinado

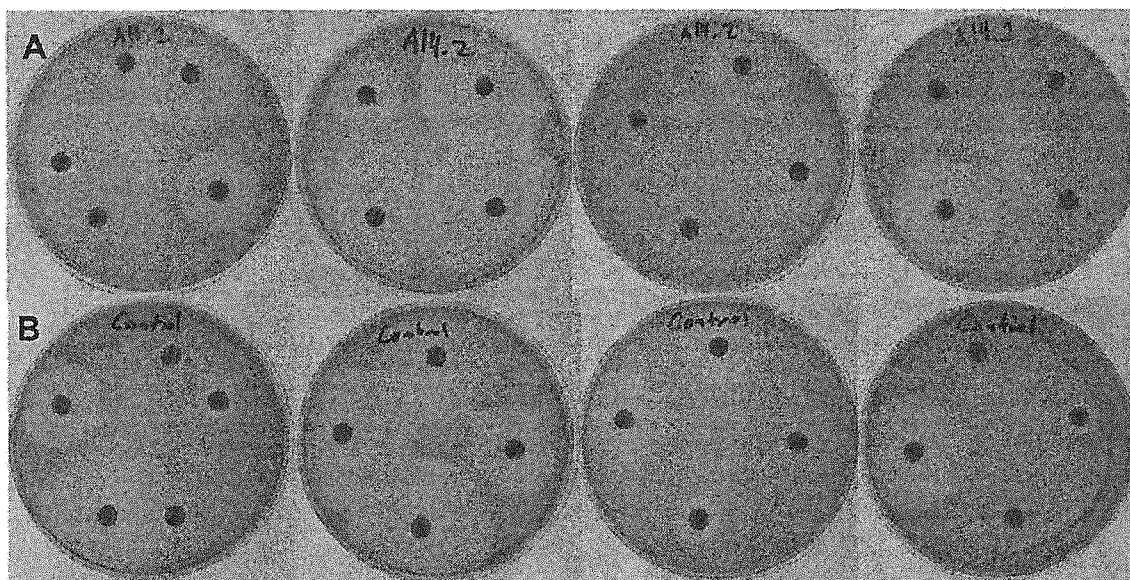


Figura 14: A) Antibiograma de la cepa seleccionada A14.2, B) Antibiograma correspondiente a la cepa control *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A .

Tabla 7: Grupos de administración de las cepas A14.2, A8.2 y A16.3, y condiciones de administración en el ensayo *ex situ* en minicolmenas en el laboratorio con abejas vivas.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Primer día	Cepa A14.2	Cepa A8.2	Cepa A16.3	Control Azúcar 50% + MRS	Control Azúcar 50%
Segundo a quinto día	Jarabe de Azúcar 50%	Jarabe de Azúcar 50%	Jarabe de Azúcar 50%	Jarabe de Azúcar 50%	Jarabe de Azúcar 50%

Tabla 8: Moléculas del sistema inmune de las abejas que fueron cuantificada a través de qPCR y su rol biológico en la inmunidad innata de la abeja.

n°	Péptidos antimicrobianos (AMPs)	Rol/Función o cuándo es inducida
1	Abaecina	Efecto contra parásitos Inhibe crecimiento de bacterias Gram+ Expresión se asocia a colonias de abejas resistentes
2	Apisimina	Se ha encontrado solo en abejas y en jalea real Estimula la proliferación de linfocitos (humanos) Aumenta la liberación de TNF-α
3	Apidaecina	Presenta diversas isoformas Presente mayormente en presencia de microbiota normal
4	Hymenoptaecina	Ricos en glicina Actúa principalmente sobre Gram+ y Gram- En larvas se expresa una menor concentración
5	Defensina 1	Actúa principalmente sobre Gram+, Gram- y hongos Está involucrada en la inmunidad social Péptido presente en jalea real Su mecanismo de acción es formando canales de membrana plasmática, reduciendo la integridad y permeabilidad de la membrana citoplasmática de patógenos

6 Defensina 2

Inmunidad individual

Se expresan más tarde que otros AMP, pero su actividad se conserva durante más de dos semanas después de la infección

Espectro amplio de actividad antibacteriana

Actividad citotóxica de defensinas contra bacterias Gram+ y algunas especies de Gram-

7 α -tubulina (Control interno)

Utilizado como control interno no presenta cambios durante la administración de las bacterias probióticas

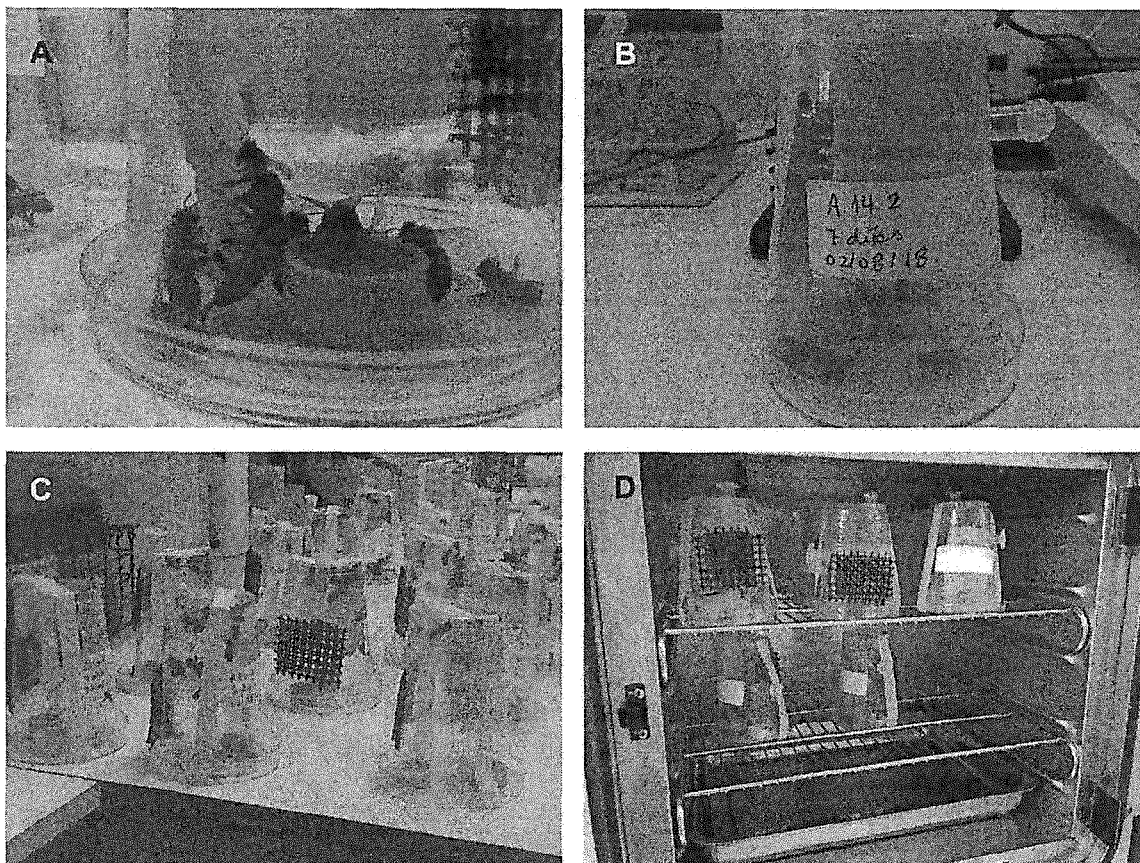


Figura 15: Ensayo de administración de cepas A14.2, A8.2 y A16.3, A) Se observa el sistema en el cual se administra la cepa y las abejas alimentándose, B) Administración de la cepa A14.2 durante 7 días, C) Se observa el ensayo realizado por duplicado y los controles cada uno con su sistema correspondiente, D) Cada sistema se dejó incubando bajo las condiciones de una colmena (estufa a 37°C)

Tabla 8: Mastermix para realizar qPCR y reactivos utilizados durante el proceso

Reactivo	Volumen (uL)	Mix por muestra uL (5X)
2 × Brilliant II SYBR Green QPCR master mix	12.5	62,5
Partidor 1 (concentración final de 200-600 nM)	1	5
Partidor 2 (concentración final de 200-600 nM)	1	5
cDNA	2	10
Agua molecular	8.5	42,5
Volumen total de rx	25	125

Tabla 9: Condiciones para la realización del ensayo de qPCR.

Ciclos	Duración	Temperatura
1	10 min	95°C
40	30 seg	95°C
	1 min	60°C
	30 seg	72°C

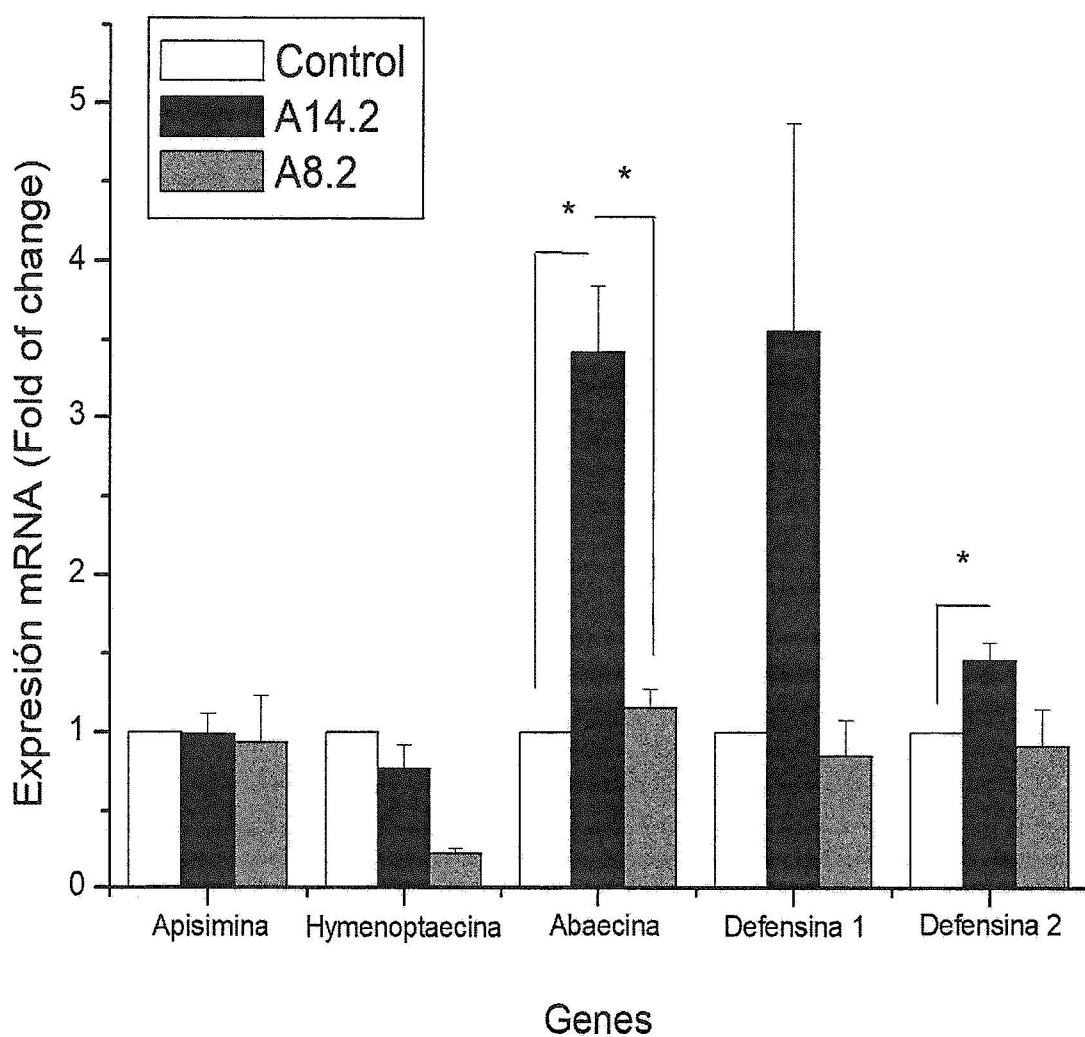


Figura 16: Expresión de la regulación de los péptidos antimicrobianos (PAMs) en abejas melíferas por las cepas bacterianas A14.2 y A8.2, a las 24 horas. *La diferencia de las medias son estadísticamente significativas en un intervalo de confianza de 95%, aplicando test t de Fisher.

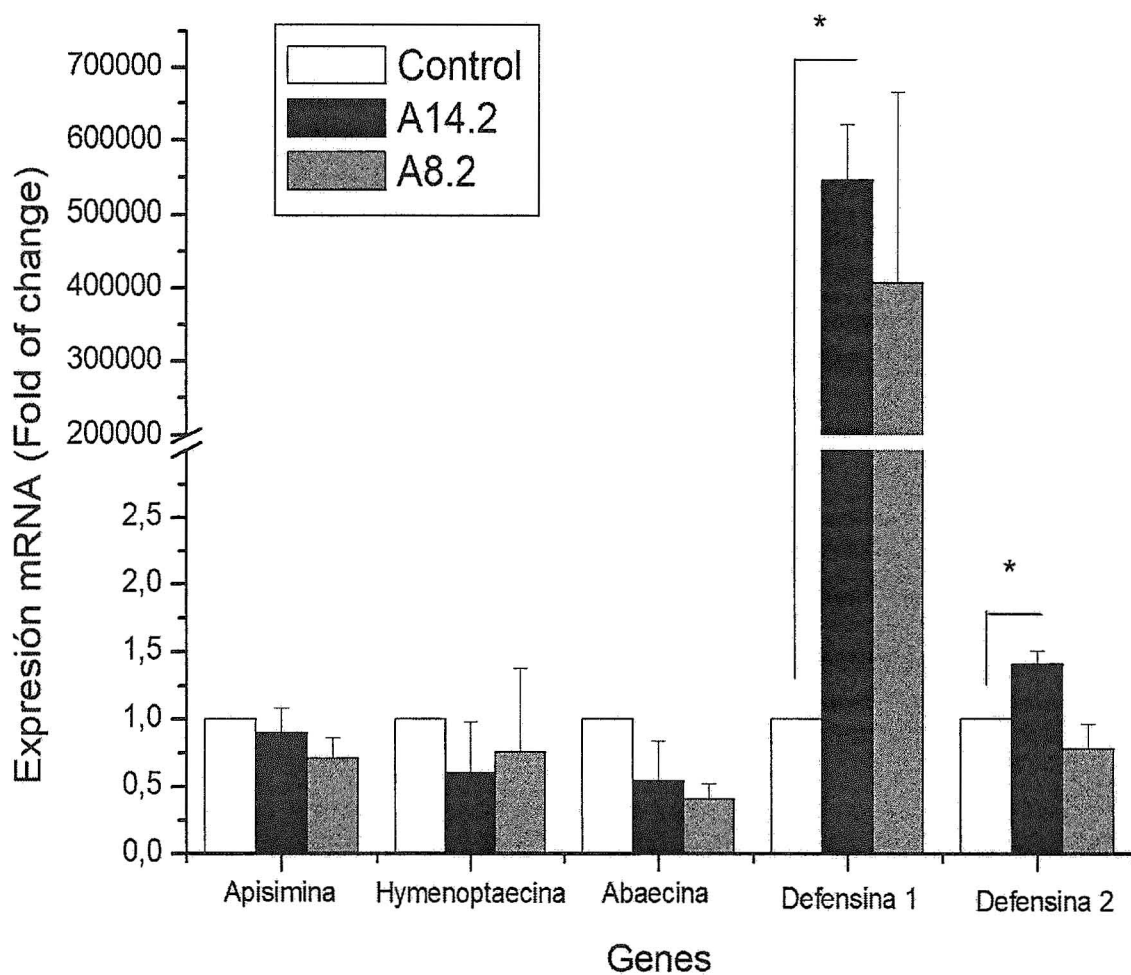


Figura 17: Cuantificación de la expresión de péptidos antimicrobianos presentes en el sistema inmune de abejas (AMPs) a través de la técnica de qPCR a los 5 días post administración de las cepas A14.2 y A8.2, en abejas. *La diferencia de las medias son estadísticamente significativas en un intervalo de confianza de 95%, aplicando test t de Fisher.

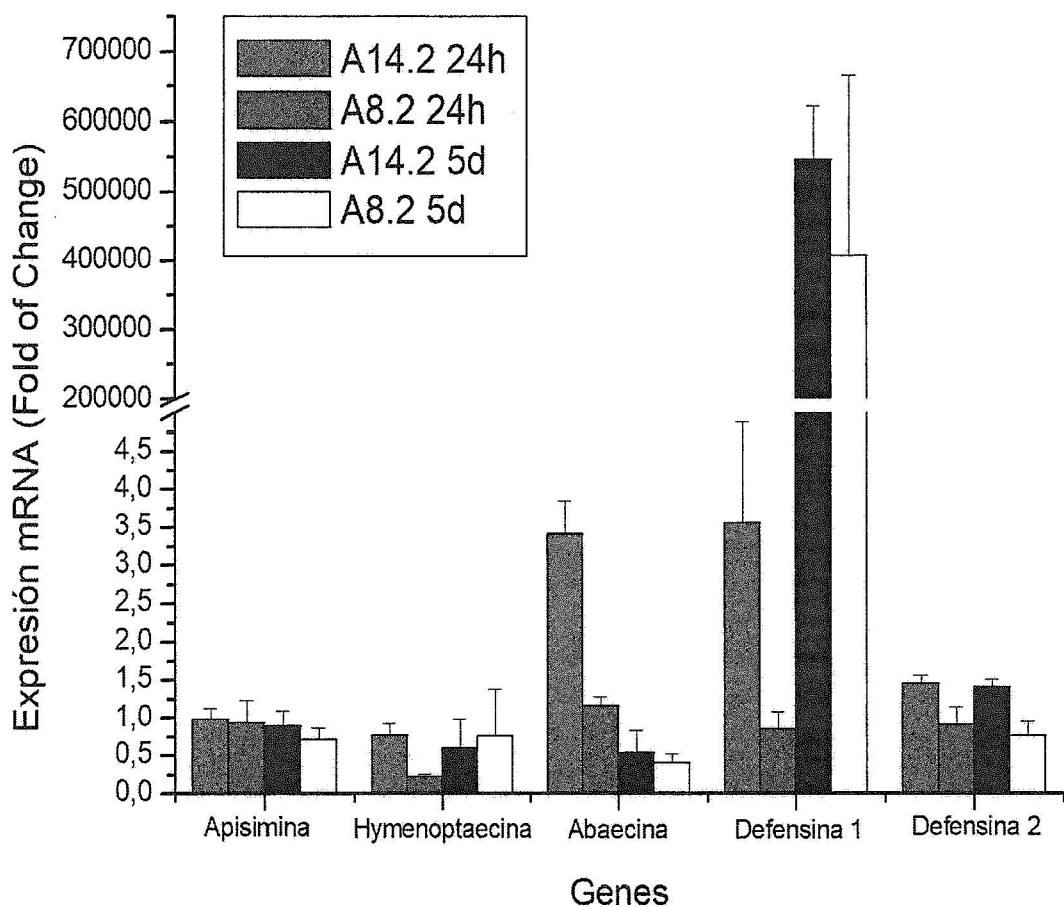


Figura 18: Cuantificación de la expresión de péptidos antimicrobianos presentes en el sistema inmune de abejas (PAMs) a través de la técnica de qPCR a las 24 horas y 5 días post administración de las cepas A14.2 y A8.2, en abejas.

Cinética de crecimiento de la cepa A14.2

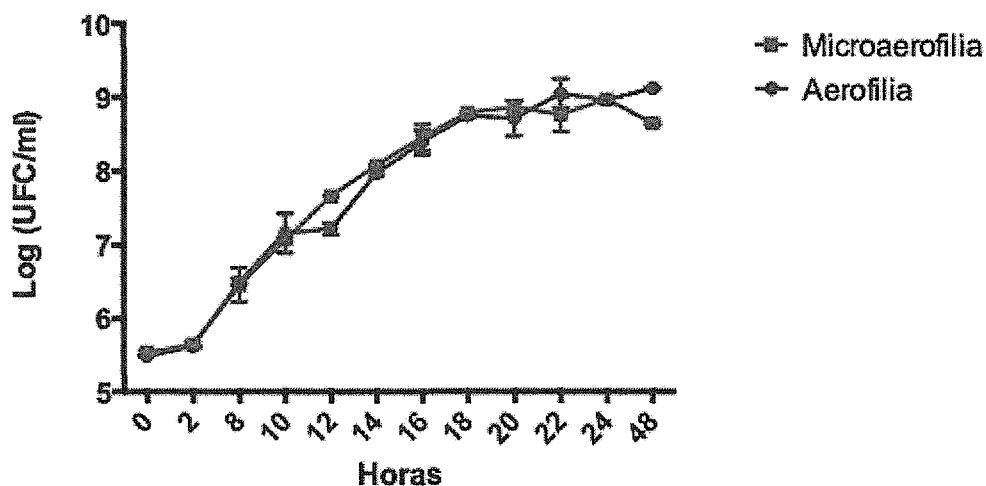


Figura 19: Cinética de crecimiento de la cepa A14.2, expresado en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro por hora de crecimiento bacteriano, tanto para condiciones de microaerofilia (baja concentración de oxígeno) como en condiciones de aerofilia (concentración ambiental de oxígeno).

Cinética de crecimiento de la cepa A14.2

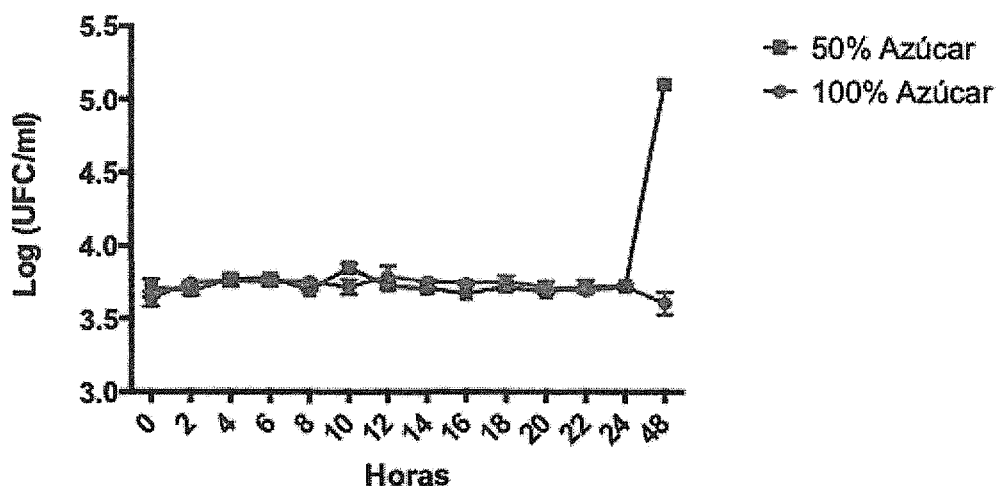


Figura 20: Cinética de crecimiento de la cepa A14.2, expresado en Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro por hora de crecimiento bacteriano en MRS suplementado con 50% de azúcar y MRS suplementado con 100% de azúcar.

Tabla 10: Parámetros de crecimiento bacteriano para la cepa A14.2. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación en condiciones de microaerofilia y aerofilia durante incubación de 48 horas a 37°C, por duplicado.

Condición de crecimiento	Velocidad de crecimiento μ (1/h)	Tiempo de duplicación g (h)
Microaerofilia 1	0,1979	1,5211
Microaerofilia 2	0,1955	1,5398
Aerofilia 1	0,1852	1,6254
Aerofilia 2	0,1924	1,5646

Tabla 11. Porcentaje de infestación de Varroa destructor en cajones administrados con la cepa A-14.2 (T) y cajones control (C)

Cajón	Diciembre	Febrero	Marzo
1 (C)	0%	4%	0%
2 (T)	2%	0%	0%
3 (C)	0%	2%	4%
4 (T)	0%	0%	2%
5 (C)	2%	4%	2%
6 (T)	0%	4%	1%

Tabla 12. Intensidad de infestación por *Nosema ceranae* de cajones administrados con la cepa A-14.2 (T) y cajones control (C). Expresado en millones de esporas por abeja

Cajón	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
1 (C)	0	5	0.4	4
2 (T)	41	4	5	0.1
3 (C)	0.6	5	0.4	0.1
4 (T)	16	0.6	0.6	0.3
5 (C)	1.5	3	8	1
6 (T)	1.9	0.4	0.1	0

Tabla 13. Producción de miel en cajones administrados con la cepa A-14.2 (T) y cajones control (C)	
Cajón	Gramos de miel por marco cosechado
2 (T)	1203.2
3 (C)	1048.8
4 (T)	1167
5 (C)	1290.3
6 (T)	1341.4

Número de abejas por marco de colmena

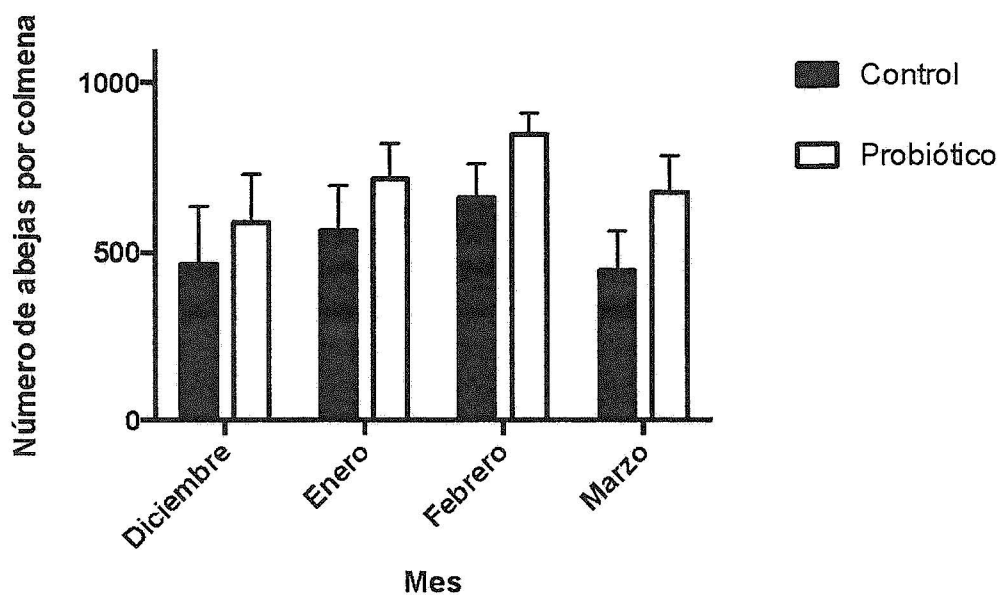


Figura 21: Gráfico que muestra el número de abejas por marco de colmena durante los meses que se administró el probiótico.

PROBEEOTIC

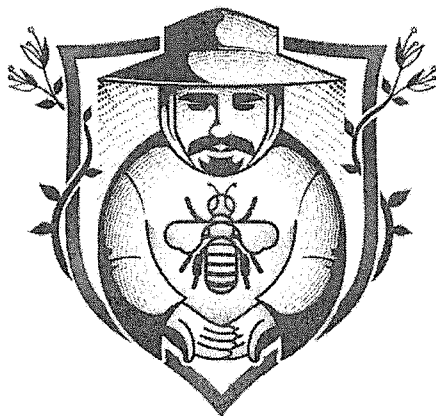


Figura 22: Logotipo realizado por publicista/diseñador de la marca del producto probiótico PROBEEOTIC.



Figura 23: Diseño de prototipo de producto probiótico PROBEEOTIC.

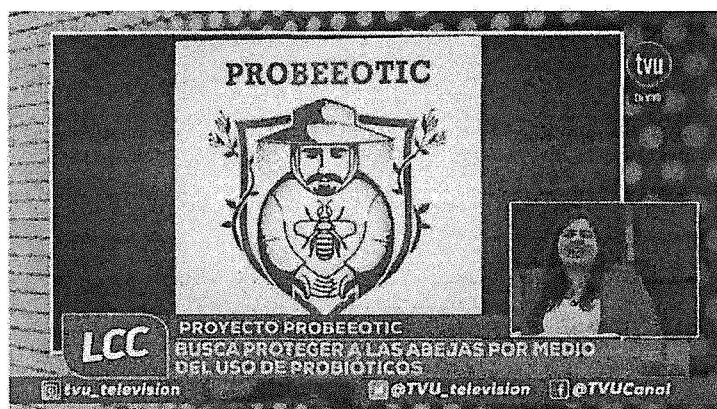
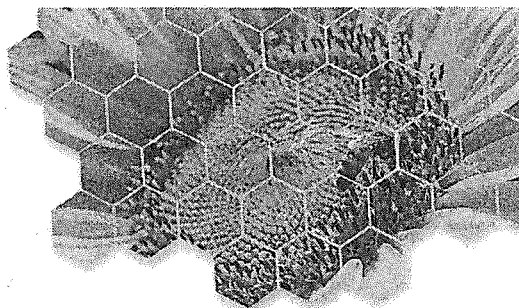
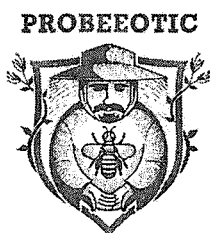


Figura 24: Difusión del proyecto en la prensa y de la marca de prototipo probiótico PROBEEOTIC.

Link acceso: (<https://www.tvu.cl/comunidades/entrevistas-lcc/2019/04/24/probeeotic-emprendimiento-local-busca-mejorar-las-defensas-de-las-abejas.html>)



Figura 25: Invitación para charla de finalización y lanzamiento del prototipo PROBEEOTIC.



Programa

“Desarrollo de un probiótico para fortalecer el sistema inmune en abejas. (*Apis mellifera*)”.

Hora	Charla
18:30	Inscripción Participantes.
18:45	Bienvenida.
18:50	Charla Inaugural.
19:00	Nutrición y Suplementos Apícolas.
19:15	¿Qué son los Probióticos?
19:20	Probееotic: Suplemento alimenticio fortalecedor del sistema inmune en abejas.
19:35	Probееotic: una visión desde el apicultor.
19:50	Preguntas
20:05	Cierre y agradecimientos
20:20	Coffee

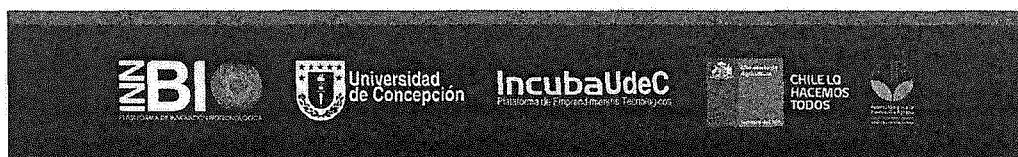
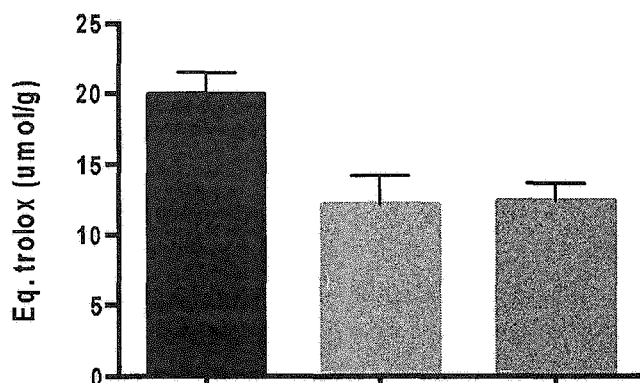


Figura 26: Programa de charla de finalización proyecto y lanzamiento del prototipo PROBEEOTIC.



Figura 28: Fotografías de almuerzo de agradecimiento profesores que nos asesoraron científicamente, Dra. Apolinaria García y Dr. Felipe Zuñiga de la Universidad de Concepción.

Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC)



Muestras de miel

Figura 28: Gráfico que muestra la capacidad antioxidante de las muestras de miel del apiario de Nonguén.

Tabla 14: Análisis de componentes polifenoles en muestras de miel de Nonguén, comparada con otras muestras de diferentes apiarios.

CODIGO MUESTRA	Resultados
0059	22,7
Muestra control 1, miel de Ulmo (Hualqui)	28,8
Muestra control 2, miel abejas felices (Yumbel)	29,1