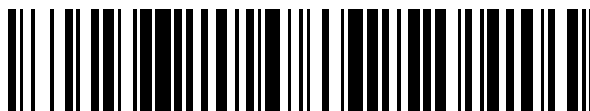


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 334**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/644** (2015.01)  
**A61K 35/00** (2006.01)  
**A23K 10/18** (2006.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)  
**C12R 1/225** (2006.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2008 PCT/SE2008/000303**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08136730**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08753931 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2142635**

54 Título: **Nuevas bacterias aisladas del tracto productor de miel de abejas melíferas**

30 Prioridad:

**03.05.2007 SE 0701050**  
**09.05.2007 US 916809 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2018**

73 Titular/es:

**OLOFSSON, TOBIAS (50.0%)**  
**Ostindiegatan 24**  
**252 71 Råå , SE y**  
**VASQUEZ, ALEJANDRA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**OLOFSSON, TOBIAS y**  
**VASQUEZ, ALEJANDRA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 683 334 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nuevas bacterias aisladas del tracto productor de miel de abejas melíferas

5 **Campo de invención**

La invención se refiere a nuevas cepas aisladas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La invención se refiere además a composiciones y a productos que comprenden estas cepas.

10 **Antecedentes de la invención**

La miel, el misterioso alimento usado en medicina desde la antigüedad, ha desconcertado a las personas durante siglos con sus efectos curativos en heridas humanas, documentados por los egipcios 2.000 años a.c.

15 La miel es producida por abejas tales como la abeja melífera *Apis mellifera*. El néctar que las abejas recogen de las plantas es un líquido dulce que se compone principalmente de sacarosa. Para cuando la abeja regresa a la colmena, gran parte de la sacarosa se ha convertido en glucosa y fructosa. La miel contiene además proteínas, vitaminas y minerales.

20 Actualmente, las propiedades terapéuticas de la miel, además de la osmolaridad y la acidez, se explican por el contenido de peróxido de hidrógeno como acción de la peroxidasa oxidasa (White *et al.*, 1963, *Biochem Biophys Acta* 73, 57-70), el origen del néctar, por su diferente contenido de ácidos flavonoides y fenólicos (Taormina *et al.*, 2001. *Int J Food Microbiol* 69(3), 217-225; Wahdan H. A. 1998. "Infection" 26(1), 26-31), y un componente sin identificar (Molan, P. C. 2001. "World Wide Wounds" (en línea); disponible en la URL:  
25 <http://www.worldwidewounds.com/2001/november/Molan/honey-as-topical-agent.html>). A pesar de los esfuerzos científicos realizados durante los últimos 30 años (Lusby, P. E., *et al.* 2005 *Arch Med Res* 36(5), 464-467; Molan, P. C. 2006. *Int J Low Extrem Wounds* 5(1), 40-54 *Int J Low Extrem Wounds* 5(2), 122; Mundo, M. A., *et al.* 2004 *Int J Food Microbiol* 1, 97(1), 1-8) aún no se ha resuelto el misterio relativo a muchos de los modos de acción de la miel.

30 Las propiedades antimicrobianas poseídas por miel hacen que la miel sea adecuada para su uso en apósitos para heridas, en los que ayuda a prevenir la infección, el desbridamiento de tejido necrótico, la desodorización de heridas malolientes y la minimización de la formación de cicatrices. Los productos que contienen miel para el cuidado de las heridas y la piel se conocen a través de los documentos WO2004000339 y WO03047642.

35 En la práctica médica de hoy en día, los antibióticos son los más usados para el tratamiento de las infecciones. Sin embargo, el uso extensivo de antibióticos ha llevado a que las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos se conviertan en un gran problema. En la industria alimentaria, los conservantes se usan ampliamente para prolongar la vida útil de los alimentos y prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos nocivos. Sin embargo, las personas están tomando conciencia de los efectos secundarios de los aditivos de los alimentos, tales como las  
40 alergias, y existe una creciente demanda de alimentos más naturales. Estos hechos han despertado un interés en la medicina tradicional y el deseo de encontrar nuevas soluciones de tratamiento y tratamientos preventivos, así como aditivos basados en la sabiduría antigua.

45 Un objetivo de la invención es obtener productos médicos, productos alimentarios y piensos que aporten sus propiedades beneficiosas de la miel.

Un objetivo adicional es producir sintéticamente miel.

Otro objetivo es obtener nuevas cepas de bacterias que tengan actividad antimicrobiana.

50

**Sumario de la invención**

Estos objetivos se han cumplido ahora de acuerdo con la presente invención al proporcionar nuevas cepas aisladas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que se han aislado de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al  
55 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja, y composiciones y productos que comprenden estas cepas y un método de producción de miel. Además, se proporciona un método de aislamiento de las cepas bacterianas.

60 Por lo tanto, los presentes inventores han descubierto las cepas bacterianas que participan estrechamente en la producción de miel. Las cepas bacterianas tienen propiedades únicas que las hacen útiles en muchos productos tales como productos médicos, productos alimentarios, bebidas y piensos. Las cepas bacterianas aisladas crecen rápidamente, a baja temperatura y en un ambiente ácido, y son capaces de crecer en soluciones de azúcar muy concentradas. Las cepas bacterianas pueden combatir eficazmente otros organismos, en especial, los organismos que estropean los alimentos y que son patógenos para los seres humanos (tales como las especies de *Listeria*,  
65 *Bacillus* y *Staphylococcus*) y las abejas melíferas (tales como las larvas de *Paenibacillus*). Con un origen único relacionado con la miel, las cepas bacterianas son adecuadas para su uso en productos que contienen miel. Estos

productos tienen propiedades únicas buenas para la salud.

Hasta la fecha, no se han aislado cepas bacterianas de la miel fresca o del tracto productor de miel de una abeja. El tracto productor de miel de una abeja incluye el tronco, la boca, el esófago y el saco de miel de una abeja melífera tal como la especie *Apis*. Por lo tanto, las tripas o el intestino no forman parte del tracto productor de miel de una abeja. La miel fresca es miel que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso, preferentemente superior al 20 % en peso. La miel que tiene un contenido de agua inferior al 18 % en peso es miel madurada, es decir, la miel que normalmente se consume.

El *Lactobacillus kunkeei* apareció en la literatura en relación con las abejas. Un informe se refiere al examen de la ecología microbiana de las tripas de larvas de avispa social *Vespa germanica* (Reeson A. F. *et al.*, 2003, *Insect Mol Biol* 12 (1), 85-91), y un segundo informe se refiere a un solo clon de la flora intestinal de larvas de abeja solitaria *Osmia bicornis* (Mohr K. I. y Tebbe C. C., 2006. *Environ Microbiol* 8(2), 258-272). Estos dos organismos carecen de vía de producción de miel, no producen miel y, por lo tanto, no son abejas melíferas.

Las enfermedades de las abejas son infecciones y afecciones parasitarias que se relacionan con una enorme pérdida de la economía agrícola. Las larvas de *Paenibacillus* causantes de la loque americana (AFB) se consideran uno de los agentes patógenos más peligrosos para las abejas melíferas, provocando la destrucción de colonias infectadas en muchos países (Genersch, E., *et al.*, 2005. *Appl Environ Microbiol* 71(11), 7551-7555). El documento JP2222654 sugiere el uso de especies de *Lactobacillus* en el intestino de abejas melíferas en un pienso para mejorar la función inmunológica de las abejas melíferas. Estas especies de bacterias se aíslan del intestino de la abeja melífera y, por lo tanto, no están adaptadas a un ambiente similar a la miel.

El documento JP 2222654 desvela *Lactobacillus bifidus* aislado del intestino de una abeja melífera. El documento desvela además pienso para abejas que contienen esta bacteria, así como *Lactobacillus lactis* (es decir, *animalis*), *Streptococcus lactis*, *Bacillus subtilis* para la estimulación del intestino de abejas melíferas.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aislada del tracto productor de miel de al menos una abeja, en el que el tracto productor de miel de una abeja consiste en el tronco, la boca, el esófago y el saco de miel, y en el que la cepa tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del deterioro de los alimentos y microorganismos patógenos, en el que la cepa bacteriana se selecciona del grupo que consiste en: la cepa de *Lactobacillus* Biut2 (LMG P-24094), la cepa de *Lactobacillus* Hma2 (LMG P-24093), la cepa de *Lactobacillus* Hma8 (LMG P-24092), la cepa de *Lactobacillus* Bma5 (LMG P-24090), la cepa de *Lactobacillus* Hon2 (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007; la cepa de *Bifidobacterium* Bin7 (LMG P-23986), la cepa de *Bifidobacterium* Hma3 (LMG P-23983), la cepa de *Bifidobacterium* Bin2 (LMG P-23984), la cepa de *Bifidobacterium* Bma6 (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007; y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica.

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja, en el que la cepa bacteriana se selecciona del grupo que consiste en: la cepa de *Lactobacillus* Biut2 (LMG P-24094), la cepa de *Lactobacillus* Hma2 (LMG P-24093), la cepa de *Lactobacillus* Hma8 (LMG P-24092), la cepa de *Lactobacillus* Bma5 (LMG P-24090), la cepa de *Lactobacillus* Hon2 (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007, la cepa de *Bifidobacterium* Bin7 (LMG P-23986), la cepa de *Bifidobacterium* Hma3 (LMG P-23983), la cepa de *Bifidobacterium* Bin2 (LMG P-23984), la cepa de *Bifidobacterium* Bma6 (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007; y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja, en el que dicha composición puede ser una composición farmacéutica.

Un tercer aspecto se refiere a un producto médico que comprende una composición farmacéutica como se describe anteriormente.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto alimentario o un pienso que comprende una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a la cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja para su uso en la preparación de un producto médico, un producto alimentario, una bebida o una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar

infecciones o enfermedades gastrointestinales.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus* Biut2 (LMG P-24094), la cepa de *Lactobacillus* Hma2 (LMG P-24093), la cepa de *Lactobacillus* Hma8 (LMG P-24092), la cepa de *Lactobacillus* Bma5 (LMG P-24090), la cepa de *Lactobacillus* Hon2 (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007; la cepa de *Bifidobacterium* Bin7 (LMG P-23986), la cepa de *Bifidobacterium* Hma3 (LMG P-23983), la cepa de *Bifidobacterium* Bin2 (LMG P-23984), la cepa de *Bifidobacterium* Bma6 (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007; y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica.

Un séptimo aspecto se refiere a un método de producción de miel que comprende añadir al menos una cepa bacteriana del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja, a una fuente de azúcar.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a un método de aislamiento de una cepa bacteriana de acuerdo con la invención que comprende: a) la separación del tracto productor de miel de una abeja, siendo el tracto productor de miel separado pasado el esófago y antes del proventrículo para evitar la contaminación procedente de las tripas o del intestino; y sacudir el tracto en un medio estéril; b) el cultivo bacteriano de la muestra de a) en un medio adecuado; c) el cultivo puro y el aislamiento de la/s cepa/s bacteriana/s obtenida/s en b) en un medio adecuado y la evaluación de la capacidad de la/s cepa/s para inhibir el deterioro de los alimentos y los microorganismos patógenos. Otras ventajas y objetivos de la presente invención se describirán con más detalle, entre otros, con referencia a los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra un árbol filogenético que incluye las cepas bacterianas de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 ilustra los patrones de RAPD de la cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei* (muestra 1) y Fhon 2 de *Lactobacillus kunkeei* (muestra 2).

La Fig. 3 ilustra la resistencia al azúcar de diferentes cepas en una solución de azúcar al 65 % que contiene sacarosa al 65 % y agua al 35 %.

La Fig. 4 ilustra la resistencia al azúcar de diferentes cepas en una solución de azúcar al 70 % que contiene fructosa al 19 %, glucosa al 19 %, sacarosa al 37 % y agua al 25 %.

#### Descripción detallada de la invención

##### Definiciones

En el contexto de la presente solicitud y de la invención, se aplican las siguientes definiciones: El término "miel" significa el líquido dulce y viscoso producido en el tracto productor de miel de diversas abejas a partir del néctar de las flores.

El término "bacteriocina" se refiere a una sustancia antibacteriana producida por una bacteria. Las bacteriocinas son proteínas o complejos proteicos biológicamente activos (agregados proteicos, proteínas lipocarbohidratadas, glicoproteínas, etc.) que muestran un modo de acción bactericida hacia microorganismos estrechamente relacionados. Varias bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico son activas contra el deterioro de los alimentos y los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos.

La expresión "fuente de azúcar" significa, en general, un disacárido soluble dulce o pequeño hidrato de carbono oligosacárido. Son ejemplos de fuentes de azúcar la miel, el azúcar, la glucosa, la fructosa, la sacarosa y la maltosa.

El término "UFC" significa unidad formadora de colonias.

La expresión "bacterias del ácido láctico, BAL" se refiere a bacterias productoras de ácido láctico, tales como las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*.

La expresión "microorganismo probiótico" se refiere a un microorganismo que forma al menos una parte de la flora transitoria o endógena y, por lo tanto, presenta un efecto profiláctico y/o terapéutico beneficioso sobre el organismo hospedador.

La expresión "marcador molecular" pretende significar un tramo de una secuencia de nucleótidos que se puede usar para identificar una cepa bacteriana o cepas bacterianas relacionadas. El marcador molecular puede usarse en ensayos de hibridación, así como en ensayos de amplificación tales como en la PCR.

El término "excipiente" significa cualquier ingrediente no activo añadido a un producto o a una composición.

En la presente memoria descriptiva, a menos que se especifique lo contrario, "un" o "una" significa "uno/a o más".

Cepas bacterianas específicas de la abeja melífera

- La invención se refiere a una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aislada del tracto productor de miel de al menos una abeja o de la miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso, siendo la cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: la cepa de *Lactobacillus* Biut2 (LMG P-24094), la cepa de *Lactobacillus* Hma2 (LMG P-24093), la cepa de *Lactobacillus* Hma8 (LMG P-24092), la cepa de *Lactobacillus* Bma5 (LMG P-24090), la cepa de *Lactobacillus* Hon2 (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007; la cepa de *Bifidobacterium* Bin7 (LMG P-23986), la cepa de *Bifidobacterium* Hma3 (LMG P-23983), la cepa de *Bifidobacterium* Bin2 (LMG P-23984), la cepa de *Bifidobacterium* Bma6 (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007; y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica. Una cepa bacteriana aislada implica al menos una cepa y, por lo tanto, puede implicar una o más cepas bacterianas. El tracto productor de miel de una abeja se puede definir además como aquel compuesto del tronco, de la boca, del esófago y del saco de miel, excluyendo así las tripas y el intestino. La abeja es preferentemente una abeja melífera de la especie *Apis*, preferentemente *Apis mellifera*. La expresión "miel fresca" se puede definir como miel de la que no han pasado más de tres días de la recolección del néctar por parte de una abeja melífera a la colmena. Además, la "miel fresca" puede tener preferentemente un contenido de agua superior al aproximadamente 20 % en peso y puede residir en celdas aún no selladas con cera. El contenido de agua del néctar, la materia prima para la producción de miel natural, recogido por las abejas puede ser de hasta el 93 % en peso. Normalmente, el contenido de agua del néctar puede ser del aproximadamente 30-50 % en peso. Por el contrario, la miel madura tiene un contenido de agua inferior al aproximadamente 18 % en peso.
- La cepa tiene preferentemente la capacidad de ser viable durante al menos 8 días en una solución de azúcar al 65 % en peso, preferentemente durante 8 días en una solución de azúcar al 70 % en peso, lo que es de gran importancia en muchas aplicaciones industriales. La cepa bacteriana de acuerdo con la invención puede tener la capacidad de inhibir el crecimiento del deterioro de los alimentos y de microorganismos patógenos, tales como especies de *Staphylococcus*, especies de *Listeria*, especies de *Clostridium*, especies de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y larvas de *Paenibacillus*.
- Una cepa bacteriana de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus* Biut2 (LMG P-24094), la cepa de *Lactobacillus* Hma2 (LMG P-24093), la cepa de *Lactobacillus* Hma8 (LMG P-24092), la cepa de *Lactobacillus* Bma5 (LMG P-24090), la cepa de *Lactobacillus* Hon2 (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica (Universiteit Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-0999 Gent, BÉLGICA) el 3 de abril de 2007, la cepa de *Bifidobacterium* Bin7 (LMG P-23986), la cepa de *Bifidobacterium* Hma3 (LMG P-23983), la cepa de *Bifidobacterium* Bin2 (LMG P-23984), la cepa de *Bifidobacterium* Bma6 (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007; y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de bacterias BCCM/LMG antes de la presentación de la presente solicitud.
- La composición de acuerdo con la invención comprende una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja. La composición comprende al menos una cepa bacteriana o una mezcla de varias cepas bacterianas. La composición puede comprender además una fuente de azúcar, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en miel, azúcar, fructosa, sacarosa, dextrina, maltosa o glucosa. La composición puede ser un producto alimentario que pueda prevenir enfermedades gastrointestinales, tal como la miel producida sintéticamente usando la cepa de acuerdo con la invención o un producto alimentario que comprenda la cepa tal como una bebida. El alimento o la bebida se puede usar como una composición o un producto probiótico, prebiótico o simbiótico. La composición puede ser además un pienso tal como un pienso para abejas.
- La composición puede ser una composición farmacéutica que pueda prevenir y/o tratar infecciones o enfermedades gastrointestinales, que comprenda un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede estar en forma de suspensión, gel, crema, polvo o cápsula.
- Un producto farmacéutico de acuerdo con la invención comprende una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, siendo dicha cepa seleccionada del grupo descrito anteriormente, aislada de miel fresca que tiene un contenido de agua superior al 18 % en peso o del tracto productor de miel de al menos una abeja, que puede prevenir y/o tratar infecciones o enfermedades gastrointestinales, y puede estar en forma de apósitos, vendajes o pulverizados.
- El método de producción de una composición de acuerdo con la invención comprende añadir al menos una cepa bacteriana de acuerdo con la invención a una fuente de azúcar. La fuente de azúcar se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en miel, azúcar, fructosa, sacarosa, dextrina, maltosa o glucosa. Dicho método puede ser la producción de miel sintética, en el que se permita que dicha al menos una cepa fermente al menos parte de una fuente de azúcar.
- Estas composiciones y productos mencionados anteriormente pueden contener bacterias vivas, liofilizadas o muertas. Además, pueden contener metabolitos y/o bacteriocinas producidos por las bacterias. Un producto que contiene cepas bacterianas liofilizadas se puede activar mediante la adición de agua.
- El método para el aislamiento de una cepa bacteriana de acuerdo con la invención comprende: a) separación del tracto productor de miel de una abeja y sacudir el tracto en un medio estéril; b) cultivo bacteriano de la muestra de a)

en un medio adecuado; c) cultivo puro y aislamiento de la/s cepa/s bacteriana/s obtenida/s en b) en un medio adecuado. El tracto productor de miel se separa pasado el esófago y antes del proventrículo para evitar la contaminación procedente de las tripas o del intestino. El método comprende además: d) la evaluación de la capacidad de la/s cepa/s para inhibir el deterioro de los alimentos y los microorganismos patógenos. Los medios para el cultivo se pueden seleccionar entre agar a base de miel, agar a base de caldo de soja triptica (TSB) (tal como el de Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), agar de zumo de tomate (TJ) (tal como el de Oxoid), medio de múltiples usos con Tween® (APT) (tal como de Merck, Darmstadt, Alemania) y agar Rogosa (tal como de Merck). Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención se desvelan en la Tabla 1. Las cepas bacterianas son cepas productoras de ácido láctico, negativas en catalasa, gram positivas, no esporuladas y que cumplen con la designación taxonómica de *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp. También son de rápido crecimiento y tienen potentes propiedades inhibitorias de patógenos. Además, las cepas bacterianas de acuerdo con la invención no son perjudiciales para los seres humanos.

Tabla 1: Cepas bacterianas aisladas

Bacterias	Cepa	Número de acceso de BCCM/LMG
<i>Lactobacillus kunkeei</i>	Fhon2	LMG P-23987
<i>Lactobacillus</i> sp.	Hon2	LMG P-24091
<i>Lactobacillus</i> sp.	Biut2	LMG P-24094
<i>Lactobacillus</i> sp.	Hma2	LMG P-24093
<i>Lactobacillus</i> sp.	Hma8	LMG P-24092
<i>Lactobacillus</i> sp.	Bma5	LMG P-24090
<i>Lactobacillus</i> sp.	Hma11	LMG P-24612
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bin7	LMG P-23986
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Hma3	LMG P-23983
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bin2	LMG P-23984
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bma6	LMG P-23985

Las cepas bacterianas que figuran en la Tabla 1 se depositaron en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica de conformidad con los depósitos internacionales en virtud del Tratado de Budapest. Un análisis filogenético en el que se compararon las secuencias de ARNr 16S de las cepas con otras cepas bacterianas de ácido láctico confirmó que las cepas aisladas pertenecían al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Como se especifica además en los ejemplos, se determinaron las secuencias casi completas del gen de ARNr 16S y se usaron las secuencias para buscar similitudes en la secuencia de ARNr 16S en el proyecto de la base de datos ribosomal (RDP) (Cole, J. R., *et al.*, 2005. *Nucleic Acids Res* 1, 33). Esta base de datos se usa para la identificación de bacterias por sus genes de ARNr 16S. La comparación de las secuencias de ARNr 16S, que están altamente conservadas entre todos los organismos, puede usarse para evaluar la relación filogenética entre organismos.

La Figura 1 desvela un árbol filogenético basado en el análisis de la matriz de distancia de aproximadamente 1.400 posiciones en los genes de ARNr 16S. El árbol se construyó usando el método de unión de vecinos, y las distancias evolutivas se estimaron usando el método Log Det/Paralineal en PAUP. Abreviaturas: (B.) *Bifidobacterium*, (L.) *Lactobacillus*, (P.) *Pediococcus*, (Paral.) *Paralactobacillus*. Números de cepas tipo: *L. buchneri* JCM1115, *L. helveticus* DSM 20075, *L. crispatus* ATCC 33820, *L. gasserii* ATCC 33323, *L. versmoldensis* KU-3, *L. kalixensis* DSM 16043, *Paral. selangorensis* LMG 17710, *P. parvulus* JCM 5889, *P. inopinatus* DSM 20285, *L. kitasatonis* JCM 1039, *L. hamsteri* DSM 5661, *L. amylolyticus* DSM 1664, *L. kunkeei* YH-15, *B. thermacidophilum* subesp. *porcinum* P3-14, *B. asteroides* ATCC 25910, *B. coryneforme* ATCC 25911, *L. acidophilus* DSM 20079, *L. rhamnosus* JCM 1136, *L. plantarum* JCM 1149, *L. casei* JCM 1134, *L. fermentum* ATCC 14931, *L. reuteri* DSM 20016, *B. animalis* subesp. *lactis* DSM 10140, *B. breve* ATCC 15700, *B. infantis* ATCC 15697.

Las cepas de lactobacilos Biut2, Hma2, Hma8 y Bma5 son nuevas especies pertenecientes al género *Lactobacillus* como se representa por el árbol filogenético. Estas cepas bacterianas constituyen un grupo sin otros parientes cercanos dentro de *Lactobacillus*. El grupo se encuentra dentro del grupo filogenético *L. delbrueckii*. Hon2 de *Lactobacillus* constituye un segundo grupo con una nueva especie dentro del género *Lactobacillus*. Sin embargo, este grupo se encuentra dentro del grupo filogenético de *Lactobacillus casei*-*Pediococcus* y el grupo filogenético de *L. delbrueckii*. La secuencia del gen de ARNr 16S de Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* es idéntica a una cepa del tipo *Lactobacillus kunkeei* descrita anteriormente, y se encuentra dentro del grupo filogenético de *Lactobacillus casei*-*Pediococcus*. Sin embargo, cuando se compara el ADN completo de los microorganismos, véase la Figura 2, es evidente que estos dos organismos no se corresponden entre sí. Las bifidobacterias Bin2, Hma3 y Bin7 están relacionadas con *Bifidobacterium asteroides*, y podrían asignarse como cepas dentro de esta especie o como nuevas especies dentro del género *Bifidobacterium*. La bifidobacteria Bma6 está estrechamente relacionada con *Bifidobacterium coryneforme*.

Hma11 también es una nueva especie perteneciente al género *Lactobacillus*.

Las cepas bacterianas de la Tabla 1 se han identificado como específicas de la abeja melífera, y se encuentran en el tracto productor de miel de la abeja melífera o en la miel fresca. Las cepas se transfieren a la miel desde el tracto

5 productor de miel de la abeja durante la producción de miel. También se han encontrado en la miel fresca la cepa Bin2 de *Bifidobacterium*, la cepa Hon2 de *Lactobacillus* y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei*. Cuando el contenido de agua de la miel disminuye por debajo del aproximadamente 18 %, no sobrevivirán bacterias no esporuladas, y por lo tanto, el aislamiento de bacterias será imposible. La miel después de 3-7 días contiene bacterias muertas, y componentes bacterianos tales como bacteriocinas y metabolitos.

10 Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención tienen un intervalo de temperaturas relativamente bajas para su crecimiento óptimo, entre aproximadamente 20 y 35 °C, tal como entre aproximadamente 21 y 32 °C, que es la temperatura del saco de miel cuando las abejas melíferas reúnen el néctar. Además, a diferencia de muchas otras bacterias de ácido láctico, las cepas bacterianas crecen rápidamente. También son tolerantes a ambientes ácidos tales como a pH 2-5, que es el pH de la miel natural.

15 La cepa Fhon2 de *Lactobacilli kunkeei* aislada es un anaerobio facultativo, débilmente positivo en catalasa, produce gas a partir de glucosa, utiliza citrato o malato en presencia de glucosa, y produce manitol a partir de fructosa. Además, la mayoría de las veces no produce amoníaco a partir de la arginina ni reduce el nitrato. Por otra parte, fermenta fructosa, glucosa, sacarosa y rafinosa.

20 Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención son capaces de crecer en medios tales como el agar de zumo de tomate con la posible adición de uno o más de agar APT, agar Rogosa y agar de soja triptico (TSB), véanse los ejemplos. La aplicación de estos tipos de medios es de vital importancia para el crecimiento de las cepas bacterianas. El crecimiento de las cepas bacterianas también se puede lograr en placas de agar a base de miel.

25 Las cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1 son productoras de diacetilo, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos tales como ácido láctico y ácido acético. Se ha demostrado que todas estas moléculas están presentes en la miel y, por lo tanto, se pueden atribuir a las propiedades antibacterianas, al sabor y a la calidad de la miel. Estos inhibidores, junto con las bacteriocinas y otras sustancias antibacterianas producidas por las cepas bacterianas, sugieren la producción de antagonistas proteicos de amplio espectro contra otras especies de bacterias y levaduras. Las cepas bacterianas son inhibidores muy potentes de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* que se encuentran comúnmente en la miel. Debido a la sensibilidad extrema de las mieles a la levadura, cabe esperar que  
30 fermenten incluso con solo 1 espora por gramo de miel si su contenido de agua es superior al 18 %. La conservación de la miel por las cepas bacterianas descritas es, por tanto, crucial para el almacenamiento a largo plazo de la miel. Las capacidades de conservación de las cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1 las hace útiles en muchas aplicaciones de conservación, no solo para la conservación de la miel, sino también para la conservación de alimentos y bebidas en general. La inhibición bacteriana es eficaz contra muchas bacterias tal como contra el deterioro de alimentos y microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos, incluyendo *Clostridium tyrobutyricum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paenibacillus larvae*.

40 La invención también se refiere a cultivos puros aislados de las cepas bacterianas que se presentan en la Tabla 1. Dichos cultivos puros se pueden proporcionar en forma de colonias en placas de agar, en forma de suspensión líquida de células o en forma de un preparado congelado, secado por pulverización o liofilizado. Los cultivos se pueden usar solos o en combinación en cualquier aplicación, tal como en un producto alimentario o una bebida, un pienso o un producto medicinal. Además, el cultivo puede contener y puede usarse para producir metabolitos, compuestos antibacterianos y/o bacteriocinas, que se pueden usar en varios productos o composiciones, tales como los ilustrados anteriormente.

50 Además, los productos o las composiciones de acuerdo con la invención pueden comprender dos o más cepas de bacterias diferentes enumeradas en la Tabla 1. Mediante la combinación de al menos dos o más de las cepas, los efectos de las bacterias se pueden utilizar de una manera sinérgica, por lo que se combatirán más especies de patógenos. Además, se mejorará la eficacia de los productos, ya que se producirán muchas bacteriocinas diferentes. Por consiguiente, se obtendrá una mezcla más natural de cepas bacterianas como la mezcla natural del estómago de miel y de la miel fresca.

55 El producto puede contener una fuente de azúcar, en el que la fuente de azúcar se selecciona del grupo que comprende miel, azúcar, fructosa, sacarosa, dextrina, maltosa o glucosa. Al producir un producto que contiene las cepas bacterianas de acuerdo con la invención en combinación con la miel, las cepas bacterianas realizarán sus funciones de forma sinérgica con la miel. Por lo tanto, se puede desear combinar los efectos de la miel con cepas bacterianas añadidas de acuerdo con la invención.

#### 60 Producto alimentario o bebida

65 Un producto o una composición de la invención comprenden al menos una cepa de acuerdo con la invención, y se puede preparar en forma de un producto alimentario o una bebida mediante el uso de los componentes o nutrientes alimentarios o de la bebida adecuados. El alimento o la bebida se puede usar como una composición o un producto probiótico, prebiótico o simbiótico.

Mediante la adición de una o más de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención se obtienen productos nuevos y mejorados. Estos productos pueden contener bacterias vivas, liofilizadas o muertas. Además, el producto puede contener metabolitos y/o bacteriocinas producidas por las bacterias. Un producto que contiene cepas bacterianas liofilizadas se puede activar mediante la adición de agua.

5 Mediante el uso de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención, se puede producir un producto altamente natural. Combinando al menos dos o más de las cepas bacterianas de la invención, los efectos de las bacterias pueden usarse de forma sinérgica. De este modo, se puede obtener una mezcla más natural de cepas bacterianas como las de la miel. El uso de una mezcla de cepas bacterianas también aumenta la posibilidad de desactivar  
10 diversos patógenos no deseados.

Un producto puede comprender una fuente de azúcar seleccionada del grupo que comprende miel o, por ejemplo, azúcar, fructosa, sacarosa, maltosa y glucosa. Al producir un producto o una composición que contiene al menos una cepa bacteriana de acuerdo con la invención en combinación con una fuente de azúcar tal como la miel, las  
15 cepas bacterianas realizarán sus funciones de forma sinérgica con la fuente de azúcar. Es deseable combinar los efectos de la miel con las cepas bacterianas añadidas de acuerdo con la invención. De acuerdo con una realización, se pueden preparar bebidas que contengan miel y bacterias tales como una bebida de agua con miel. La bebida de agua con miel se puede preparar mezclando agua, miel, cepas bacterianas de acuerdo con la invención y un zumo de fruta tal como zumo de limón, zumo de lima, zumo de naranja o zumo de manzana. La concentración de cepas  
20 bacterianas en la bebida puede ser de aproximadamente  $10^1$  a  $10^{14}$  UFC/g de producto, tal como de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  UFC/g producto. Esta concentración de cepas bacterianas también se puede usar en una bebida sin miel añadida. Se puede usar una concentración de aproximadamente  $10^5$  UFC/g de producto en un producto que imite la concentración natural de cepas bacterianas de la miel fresca. La bebida de agua con miel también puede prepararse en forma de un concentrado, con menos o sin contenido de agua, y con  
25 cepas bacterianas liofilizadas y zumo como se ha mencionado anteriormente.

Un producto alimentario con miel se puede usar además como un ingrediente para la producción de otros productos alimentarios.

30 Es un objetivo de la invención hacer uso de alimentos o bebidas que contengan cepas bacterianas más fácilmente accesibles, frecuentes y habituales para cualquier consumidor con el fin de aumentar, complementar y equilibrar la flora intestinal, lo que dará lugar a ventajas en términos salud y actividad deportiva diaria.

De acuerdo con otra realización, se proporcionan alimentos o bebidas funcionales que contienen mezclas de cepas bacterianas que son capaces de llegar al intestino de una forma viva o viable, y también sus bacteriocinas y/o  
35 metabolitos, estableciéndose en la flora bacteriana, influyendo o creciendo, realizando así importantes acciones beneficiosas para la salud humana. Las cepas bacterianas que llegan al intestino también pueden estar en estado no vivo, y luego realizar una acción beneficiosa a través de sus bacteriocinas y/o metabolitos producidos. El alimento o la bebida pueden usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

40 Los ejemplos de bebidas son productos lácteos, zumos, vino, vinagre, Glögg sueca, cerveza, refrescos, limonada y productos de sidra. Una bebida que comprende una o más cepas bacterianas de acuerdo con la invención y la adición de miel puede estar en forma de agua con miel contra el resfriado o el dolor de garganta, como recuperación para atletas, para personas con estrés o para la recuperación de pacientes inmunosupresores hospitalizados. Una  
45 bebida puede caracterizarse por su constitución especial con minerales y otras sustancias que aportan el efecto natural deseado como en la miel fresca.

La bebida o el alimento con las cepas bacterianas añadidas de acuerdo con la invención se beneficiarán del efecto de conservación de las cepas bacterianas. La fermentación de la levadura se inhibirá potentemente. Además, las  
50 cepas bacterianas se pueden usar en la producción de vino para finalizar la fermentación de la levadura. Las bacterias se mantendrán como bacterias beneficiosas para la salud de origen natural en el producto.

El alimento o la bebida también puede contener aditivos tales como, a modo de ejemplo, vitaminas, minerales, antioxidantes, fenoles, fibras, oligosacáridos, fructooligosacáridos o inulina.

55 Los ejemplos de productos alimentarios son productos cárnicos, productos lácteos, productos de frutas, productos de pescado, productos de panadería o productos vegetales. Un producto alimentario puede contener una fuente de azúcar tal como la miel. El producto alimentario puede ser miel fresca o miel madura con bacterias añadidas de acuerdo con la invención. El producto alimentario de miel puede prepararse mediante la adición de las cepas  
60 bacterianas de acuerdo con la invención o una mezcla de cepas bacterianas de acuerdo con la invención a la miel u otros productos. La concentración de cepas bacterianas se puede seleccionar de manera adecuada para lograr una concentración de aproximadamente  $10^1$  a  $10^{14}$  UFC/g de producto tal como de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  UFC/g de producto.

65 Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención también se pueden usar como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos y bebidas. Los ejemplos de alimentos y bebidas son pan, suero de leche, cacao, vainilla,



café, queso, queso verde, pepinos, aditivos para piensos, productos de pescado fermentado, leches fermentadas, aceite de oliva, chucrut, salchichas, yogurt, vino, cerveza, sidra y miel.

#### Producto medicinal

5 Una cepa bacteriana de acuerdo con la invención es valiosa para prevenir o tratar infecciones, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos. Las cepas y los productos que las contienen pueden transferirse a la piel humana o animal en formas tales como pomadas, cremas, pulverizados, geles y soluciones líquidas. Las cepas bacterianas también se pueden incluir en productos tales como apósitos, parches dérmicos, geles o vendajes que  
10 contengan cantidades eficaces de cepas bacterianas en diversas partes de los productos con el fin de lograr el resultado deseado de prevenir o inhibir las infecciones. Los productos se pueden usar para el tratamiento de heridas, llagas, quemaduras, cicatrices, úlceras por decúbito, lesiones diabéticas, acné, eccema, dermatitis, cáncer, catarro, erupción cutánea, infecciones por hongos, síndrome de choque tóxico, infecciones fúngicas, infecciones víricas y úlceras.

15 El producto se puede usar en el tratamiento de infecciones bacterianas, víricas, por levaduras o por hongos. Las infecciones víricas de interés pueden ser infecciones por el virus del herpes, incluyendo el herpes labial. Las infecciones bacterianas que se deben combatir mediante las cepas bacterianas de acuerdo con la invención pueden ser infecciones por especies seleccionadas del grupo que comprende especies de *Staphylococcus*, especies de *Clostridium*, especies de *Bacillus*, especies de *Enterococcus*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Listeria* y *Escherichia coli*.

20 Los productos medicinales pueden incluir las cepas bacterianas de acuerdo con la invención en combinación con una fuente de azúcar tal como la miel o miel sintética. El producto se beneficiará de los efectos conocidos de la miel en combinación con los efectos de las cepas bacterianas. El producto puede incluir porcentajes variables en peso de miel cremosa o cristalizada, miel secada por pulverización, liofilizada, secada al aire y/o líquida. La miel puede ser fresca o madura.

30 El producto medicinal puede incluir los metabolitos y/o bacteriocinas producidos por las cepas bacterianas de acuerdo con la invención. Este producto también puede esterilizarse de manera conocida para lograr un producto estéril sin ninguna bacteria viable. El producto se beneficiará de las bacteriocinas y/o los metabolitos previamente producidos por las cepas bacterianas.

35 Los principios activos, es decir, las cepas bacterianas vivas o muertas, y las bacteriocinas y/o los metabolitos pueden comprender del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 100 %, tal como del 1 % al 70 %, tal como del 5 % al 50 % en peso del producto final. Un producto típico contendrá en una formulación farmacéutica de un gramo una concentración de  $10^1$  a  $10^{14}$  UFC, tal como de  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  UFC de bacterias viables o muertas.

40 El producto medicinal puede incluir al menos una o más de las cepas bacterianas de la invención o bacteriocinas producidas a partir de una o más de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención. Una mezcla de cepas bacterianas o bacteriocinas de diferentes cepas bacterianas puede ser beneficiosa con respecto a la eficacia de la inhibición del patógeno.

45 El producto medicinal también puede incluir las cepas bacterianas en un chicle. Este producto puede usarse en el tratamiento de, por ejemplo, la gingivitis y la placa. Los ingredientes de un producto de chicle pueden ser uno o más de miel, cera de abeja, goma y otros ingredientes conocidos en la técnica.

50 Los ingredientes opcionales del producto medicinal incluyen productos farmacéuticos tales como antibióticos, fungicidas y otros agentes antibacterianos, vitaminas, agentes de tamponamiento, agentes colorantes, minerales, aromas, fragancias, agentes gelificantes u otros compuestos químicos tales como antioxidantes o calcio.

55 El producto medicinal puede incluir un material base en forma de película, apósito tejido, apósito laminar estratificado, parche, tira, configuración cuerda o envoltorio. Las opciones para el material base incluyen película de gel de agar, apósito de alginato, hidrocoloide, apósito de espuma, etcétera. Además, el producto puede comprender las cepas bacterianas de acuerdo con la invención junto con vehículos, excipientes y/o diluyentes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Los vehículos para formulaciones secas pueden ser trehalosa, maltodextrina, harina de arroz, celulosa microcristalina, estearato de magnesio, inositol y otros. Los vehículos líquidos o a base de gel pueden ser agua, soluciones salinas, alcoholes y similares. Después, se puede formar un producto medicinal  
60 aplicando las cepas bacterianas a un absorbente o similar.

65 El producto medicinal puede estar en forma de producto farmacéutico usando vehículos farmacéuticamente aceptables junto con las bacterias de acuerdo con la invención. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diversos diluyentes y excipientes tales como cargas, extendedores, aglutinantes, humectantes, disgregantes, tensioactivos, lubricantes y otros vehículos conocidos en la técnica. La dosis puede estar en forma de una píldora, un comprimido, un polvo, una solución, una suspensión, una emulsión o gránulos. Los comprimidos

pueden estar recubiertos con un material de recubrimiento convencional. La cantidad de cepas bacterianas del producto farmacéutico puede seleccionarse de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{14}$  UFC/dosis del producto, tal como  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  UFC. El producto medicinal puede usarse para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

5

Pienso

Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención pueden ser valiosas en los piensos para las abejas y las larvas de abeja. Estos productos pueden estar en forma de un pienso probiótico usado para fortalecer o restablecer la flora microbiana de las abejas o larvas de abejas. Las cepas bacterianas usadas son cepas bacterianas naturales del tracto productor de miel de una abeja. Por lo tanto, las cepas bacterianas de acuerdo con la invención no desactivarán ninguna cepa bacteriana de origen natural dentro del nicho del tracto productor de miel. El uso de otras cepas bacterianas beneficiosas que no se originan en el tracto productor de miel, en productos similares, podría alterar la flora bacteriana natural de la abeja melífera de manera negativa.

10

15

Por lo tanto este tipo de pienso de acuerdo con la invención será particularmente interesante.

El pienso puede incluir una o varias de las cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1. Una mezcla de cepas bacterianas puede ser beneficiosa en cuanto a la eficiencia del tratamiento.

20

La concentración de cepas bacterianas se puede seleccionar adecuadamente a fin de lograr una concentración de aproximadamente  $10^1$  a  $10^{14}$  UFC/g de producto tal como  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$  o  $10^{13}$  UFC/g de producto.

25

El pienso puede usarse para la protección de la abeja melífera o larvas de abeja melífera de las bacterias patógenas, virus, hongos o ácaros. Los organismos que conducen comúnmente a infecciones letales y que deben ser combatidos por el producto son larvas de *Paenibacillus*, *Melissococcus plutonius*, *Ascospaera apis*, *Varroa destructor*, virus de ala deformada o *Nosema apis*.

30

La cepa bacteriana o la mezcla de cepas bacterianas se puede administrar a la abejas melíferas o larvas de abejas melíferas en forma de un polvo, una solución o un sólido. Un polvo puede estar en forma liofilizada, secada por pulverización o secada al aire. Un polvo es sencillo de manejar, transportar, almacenar y tiene una fecha de caducidad más expandida. El polvo o la solución se pueden rociar o pulverizar sobre las abejas o larvas. La administración eficaz también se puede lograr pulverizando o rociando un polvo o una solución directamente sobre el nido de abejas.

35

El pienso también puede contener una fuente de azúcar. La fuente de azúcar puede ser miel, azúcar, sacarosa, glucosa, fructosa, dextrina, maltosa u otras formas de azúcar. La fuente de azúcar puede ser usada por las abejas melíferas o las larvas de abejas melíferas como fuente de energía. Al usar miel en la solución de azúcar se obtienen varias ventajas. En primer lugar, las abejas están más ansiosas por usar una solución que contenga miel que una solución que contenga sacarosa pura. En segundo lugar, la miel contiene componentes beneficiosos adicionales tales como minerales, vitaminas y proteínas.

40

Cuando se usan las cepas bacterianas de acuerdo con la invención, un pienso para abejas melíferas que las contienen se beneficiará de las propiedades de inhibición de bacterias y levadura de las bacteriocinas y los metabolitos. Por consiguiente, la solución de azúcar no fermentará, como suele ser el caso de las soluciones de azúcar.

45

El pienso también puede contener polen, soja, pan de abejas o pan de abejas sintético, importantes fuentes de alimentación para las abejas melíferas y larvas de abeja melífera durante el otoño, invierno y primavera. El pienso también puede contener otros aditivos tales como vitaminas, minerales, grasas, hidratos de carbono y proteínas.

50

La administración de las cepas bacterianas es particularmente importante en el otoño o el invierno, cuando las colonias de abejas melíferas están débiles y descansando. Las cepas bacterianas también funcionarán como conservantes de la miel o del azúcar presente en la colonia. En el período del otoño, invierno y principios de la primavera, cuando no hay néctar disponible, las abejas y las larvas de abejas son particularmente vulnerables a las infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias. Mediante la administración de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención a las abejas melíferas y larvas de abejas melíferas, las bacterias crecerán hasta un estado viable cuando lleguen al tracto productor de miel de la abeja melífera, que es su entorno natural original. De este modo, las abejas y las larvas habrán adquirido una protección más eficaz contra los patógenos de las abejas melíferas y las larvas.

55

60

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no pretenden limitar de ninguna manera ni forma la invención, ya sea explícita o implícitamente.

65

## Ejemplos

**EJEMPLO 1 - Cosecha de colmenas de abejas**

5 Se trasladó una pequeña colmena de abejas con aproximadamente 12.000 abejas a un campo de flores silvestres de frambuesa situado en la reserva natural Kullaberg que se encuentra en el noroeste de Skåne, en el sur de Suecia. No florecieron otras flores en el área inmediata durante ese tiempo, y la colmena de abejas se vació de su miel al iniciarse el experimento. En la segunda semana, se realizaron muestreos en flores frescas de frambuesa de alrededor de la colmena, en abejas obreras salientes y entrantes, y en la miel fresca de flores de frambuesa de la colmena. Además de esas muestras, la miel de frambuesa cosechada se guardó y se analizó tras dos meses de almacenamiento. Las muestras se cultivaron en cuatro tipos diferentes de medios de incubación para todos los fines bacterianos y para la selección de laboratorio. La identidad bacteriana se reveló mediante el análisis de los genes de ARNr 16S usando tanto las técnicas de clonación como los cultivos puros.

**15 EJEMPLO 2 - Aislamiento de bacterias de la abeja melífera**

Se recogieron 20 flores de frambuesa, 10 abejas obreras entrantes y 10 abejas obreras salientes, y 10 abejas nodrizas, y se clasificaron en diferentes tubos estériles de 10 ml que contenían 5 ml de solución salina fisiológica estéril (NaCl al 0,9 % p/v, Tween 80 al 0,1 % p/v y peptona al 0,1 % p/v). Además, se recogieron 0,5 ml de miel fresca, cinco larvas de abeja melífera (2-5 días de vida), cinco cabezas de abeja melífera, cinco estómagos de abeja melífera y el intestino posterior de una abeja melífera, por separado en un tubo estéril de 1,5 ml que contenía 0,9 ml de solución salina fisiológica. Se realizó el análisis de la boca y del tronco de la abeja separando la cabeza del cuerpo con un bisturí y pinzas estériles. Se agitaron las cabezas en medio de dilución estéril seguido de cultivo bacteriano. El análisis del estómago de la abeja melífera se llevó a cabo mediante la escisión del estómago de abeja melífera lleno de néctar pasado el esófago y antes del proventrículo con un bisturí estéril y pinzas estériles, garantizando que ninguna parte del intestino contaminara las muestras. Se agitaron los tubos y se transportaron de inmediato al laboratorio. Se congelaron tubos con 0,5 ml de suspensión y se almacenaron a -20 °C para el análisis directo del gen de ARNr 16S.

30 Las cepas bacterianas que figuran en la Tabla 1 se aislaron viables de las abejas melíferas sanas. Se descubrió que la flor productora de néctar que da lugar al mayor número de bacterias de acuerdo con la invención es la flor de frambuesa. Las muestras intestinales de cepas bacterianas demostraron que no hay números de las cepas de acuerdo con la invención.

**35 EJEMPLO 3 - Cultivo de bacterias del estómago con miel**

A partir de las muestras descritas en el Ejemplo 2 se realizó una serie de dilución con solución salina fisiológica estéril, y se extendió un volumen de 0,1 ml sobre diferentes medios de cultivo. Se obtuvieron cultivos en crecimiento y puros en diferentes medios (véase la Tabla 2) a partir de diferentes diluciones con agar de caldo de soja triptica (TSB) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), agar de zumo de tomate (TJ) (Oxoid), medio de múltiples usos con Tween® (APT) (Merck, Darmstadt, Alemania) y agar Rogosa (Merck). Los medios se produjeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La combinación usada de medios de aislamiento demostró ser de vital importancia para el crecimiento de las bacterias. Todos los aislamientos crecieron muy bien en Rogosa a excepción de Bma5, que tuvo un crecimiento restringido, y Fhon2, que apenas creció en Rogosa. Por el contrario, Fhon2 (*Lactobacillus kunkeei*) creció muy bien en agar de zumo de tomate junto con las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* (Bin2, Bin7, Bma6 y Hma3). (Biu2, Hon2, Hma2, Hma8, Hma11 y Bma5) tuvieron un crecimiento restringido en agar de zumo de tomate. Los aislados se cultivaron tanto aeróbica como anaeróbicamente durante 2-3 días a 37 °C. Se seleccionaron aleatoriamente de diez a treinta colonias de todos los medios usados, que contenían de 30 a 300 colonias cada uno, y se volvieron a cultivar para obtener pureza (aislamientos).

50

**Tabla 2: Cultivo de bacterias en medios específicos**

Bacterias	Medios de cultivo
Cepa de <i>Bifidobacterium</i> Bin2	Tomate, APT, Rogosa, TSB
Cepa de <i>Bifidobacterium</i> Bin7	Tomate, APT, Rogosa, TSB
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Biut2	Tomate, APT, Rogosa, TSB
Cepa de <i>Bifidobacterium</i> Hma3	Tomate, Rogosa
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Hon2	Tomate, APT, Rogosa
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Hma8	Tomate, Rogosa, APT
Cepa de <i>Bifidobacterium</i> Bma6	Tomate, TSB, Rogosa
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Bma5	Tomate, Rogosa, APT
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Hma2	Tomate, Rogosa, APT
<i>Lactobacillus kunkeei</i> Fhon2	Tomate, APT, TSB, Rogosa
Cepa de <i>Lactobacillus</i> Hma11	Tomate, Rogosa, APT

**EJEMPLO 4 - Clonación y amplificación por PCR**

Se dispuso una colonia de los aislados purificados en tiras Thermo-Strips 0.2 (Abgene, Surrey, RU) junto con 0,1 ml de agua estéril y perlas de vidrio (0,106 mm, Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU.). Se desintegraron células agitando durante 45 min en un miniagitador MS1 (IKA Works, INC, Wilmington, EE.UU.). Tras la centrifugación, 20.200 xg durante 5 minutos en una minicentrífugadora Galaxy (VWR, Pensilvania, EE.UU.), se usó 1 µl del sobrenadante en la siguiente reacción de PCR.

La amplificación se realizó con cebadores diseñados para hibridarse con regiones conservadas de genes bacterianos de ARNr 16S. El cebador directo ENV1 (5'-AGA GTT TGA TII TGG CTC AG-3') correspondía a las posiciones 8-27 del ARNr 16S de *Escherichia coli*, y el cebador inverso ENV2 (5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3') correspondía a las posiciones 1511-1492 (Brosius *et al.*, 1978). La reacción de PCR contenía 5 µl de 10 x tampón de PCR (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 500 mM, pH 8,3), 200 µmol l<sup>-1</sup> de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 2,5 U de ADN polimerasa de Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 10 pmol de cada cebador y 1-10 µl de molde en un volumen total de 50 µl. La amplificación se realizó con un Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de la siguiente manera: 30 ciclos a 95 °C durante 15 s, a 48 °C durante 30 s y a 72 °C durante 90 s, seguidos de una etapa de elongación a 72 °C durante 10 min. El producto de la PCR se almacenó a -20 °C para la secuenciación.

De acuerdo con el procedimiento para el kit de ADN tisular EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania), se añadieron 190 µl de tampón G2 y 10 µl de proteinasa K a los microgránulos, y se mezclaron con un miniagitador MS1 durante 2 min. Las muestras se incubaron en un baño de agua a 56 °C (Julabo SW1, Alemania) hasta que se disolvieron los microgránulos. Cada 15 minutos, las muestras se mezclaron durante 1 minuto para acelerar el proceso. Se añadieron perlas de vidrio (0,106 mm) y se desintegraron las células agitando durante 45 minutos en un miniagitador MS1. Tras la centrifugación a 20.200 xg durante 5 minutos en una minicentrífugadora Galaxy, se trataron adicionalmente 0,1 ml del sobrenadante de acuerdo con el procedimiento para el kit de ADN tisular EZ1 en una versión 1.3 de BioRobot EZ1 (Qiagen Instruments AG, Alemania), usando la tarjeta de tejido de Qiagen. Al final del proceso, el ADN se eluyó en 200 µl de agua estéril.

Se realizaron amplificaciones por PCR en cuatro duplicados para cada muestra para reducir al mínimo los sesgos introducidos por la PCR. La amplificación se llevó a cabo de la misma manera que para los aislados, pero con una temperatura de hibridación de 50 °C. Se agruparon entre sí los cuatro productos de PCR de cada preparación de ADN y se comprobaron procesándolos en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) (Tipo III, High EEO, Sigma, ST Louis, EE.UU.). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV.

Los productos de PCR agrupados se purificaron mediante el kit de purificación de bandas de gel y ADN de PCR GFX™ (Amersham Biosciences, RU). Se ligaron los productos purificados en un vector de clonación TOPO TA (Invitrogen, EE. UU.) y se transformaron en células competentes de *E. coli* pCR II-TOPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las colonias se detectaron de color azul/blanco en agar LB con Kanamicina (Sigma) y X-gal (Promega). Se escogieron veinticuatro colonias blancas al azar de cada muestra y se volvieron a cultivar.

Para recuperar el ADN clonado, se llevó a cabo la amplificación con los cebadores universales M13 directo (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') y M13 inverso (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') diseñados para hibridarse al principio y al final del vector. La reacción de PCR contenía 5 µl de 10 x tampón PCR (Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 500 mM, pH 8,3), 200 µmol l<sup>-1</sup> de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 2,5 U de ADN polimerasa de Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 10 pmol de cada cebador y 1-10 µl de molde en un volumen total de 50 µl. La amplificación se realizó con un Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), usando una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 28 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, a 55 °C durante 1 minuto y a 72 °C durante 1 minuto, seguidos de una etapa de elongación a 72 °C durante 10 min. El producto de la PCR se almacenó a -20 °C para la secuenciación.

**EJEMPLO 5 - Secuenciación y análisis filogenético de ARNr 16S**

Los productos de la PCR procedentes de bacterias aisladas fueron secuenciados por una compañía de secuenciación (MWG Biotech AB, Ebersberg, Alemania) con cebadores universales ENV1 y ENV2. La búsqueda de estas secuencias de ARNr 16S parciales se realizó frente al GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Rockville Pike, Bethesda, MD) usando la opción de búsqueda de similitud Advanced BLAST (Altschul, S. F., *et al. Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402), accesible desde la página de inicio del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A modo comparativo, las secuencias también se buscaron en otro software, el Ribosomal Database Project II, accesible desde la página de inicio (<http://rdp.cme.msu.edu>). Las secuencias parciales fueron de aproximadamente 1.400 pares de bases (intervalo de 50-1.500 pb).

El árbol filogenético de la Figura 1 se obtuvo usando los siguientes programas informáticos de software: Clustal X (versión 1.81) (Thompson, J. D., *et al.*, 1997. *Nucleic Acids Res* 24, 4876-4882) para la alineación, BioEdit (versión 6.0.7) (Hall, T., BioEdit Sequence Alignment Editor, Isis Pharmaceuticals, Inc) para la edición, y PAUP (versión 4.0 beta) (creado por D. Swofford) para el cálculo del árbol filogenético. El árbol se construyó usando el método de unión

de vecinos (Saitou N. y Nei M. 1987. *Mol Biol Evol* 4, 406-425) en PAUP con el modelo LogDet/Paralineal de estimación de distancia evolutiva.

**EJEMPLO 6 - Patrones de fermentación**

5 Se usó el sistema API 50CHL (BioMerieux SA, Francia) para identificar provisionalmente las cepas bacterianas por sus patrones de fermentación de hidratos de carbono, véase la Tabla 3. Se recogieron cultivos en agar de zumo de tomate y se suspendieron en el medio de suspensión proporcionado con el kit. Se inocularon tiras API y se analizaron (después de 48 y 82 h) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10

Tabla 3: Patrones de fermentación

n.º de IFA	Principios activos	Hon2	Hma2	Biuf2*	Hma8	Bma5	Fhon2	Hma3	Bin2	Bin7	Bma6
0	Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Arabinosa D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Arabinosa L	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
5	Ribosa D	+	-	-	+/	-	-	+	+	+	+
6	Xilosa D	-	+/	-	-	-	-	+	+	+	-
7	Xilosa L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Metil-βD-xilopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Galactosa D	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
11	Glucosa D	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Fructosa D	+	-	+	+/	+	+	+	-	-	-
13	Manosa D	-	-	-	+/	+	-	-	-	-	+
14	Sorbosa L	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
15	Ramnosa L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	+/	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Manitol D	+	-	-	-	-	+/	-	-	-	-
19	Sorbitol D	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
20	Metil-αD-manopiranosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Metil-αD-glucopiranosido	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	IV-acetil-glucosamina	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
23	Amigdalina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/
24	Arbutina	+/	-	+	-	+	-	+/	-	+	+/
25	Citrato férrico de esculina	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
26	Salicina	-	-	-	-	+/	-	+	+	+	+/
27	Celobiosa D	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
28	Maltosa D	+	-	+	+/	-	-	+	-	-	+
29	Lactosa D (origen bovino)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
30	Melibiosa D	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
31	Sacarosa D (sacarosa)	+	-	-	-	+/	+	+/	-	+/	-
32	Trehalosa D	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
33	Inulina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitosa D	+/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Rafinosa D	-	+/	-	-	-	-	+	-	+	-
36	Amidón (almidón)	-	-	+/	-	-	-	-	-	-	-
37	Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
40	Turanosa D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	Lixosa D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

42	Tagatosa D	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	Fucosa D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Fucosa L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	Arabitól D	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Arabitól L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Gluconato de potasio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	2-cetogluconato de potasio	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5-cetogluconato de potasio	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* = El medio de CHL se suplementó con casaminoácidos al 5 % p/v suspendidos en agua estéril y filtrados en condiciones estériles.

**EJEMPLO 7 - Patrones de fermentación e identificación genética del ADN de la cepa tipo de *L. kunkeei* y de la cepa Fhon2 de *L. kunkeei***

Se usó el sistema API 50CHL (BioMerieux SA, Francia) para comparar la cepa Fhon2 con la cepa tipo YH-15 de *L. kunkeei* según sus patrones de fermentación de hidratos de carbono. Se recogieron cultivos en agar de zumo de tomate y se suspendieron en el medio de suspensión proporcionado con el kit. Se inocularon tiras API y se analizaron (tras 48 y 82 h) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados divergieron en que la cepa tipo YH-15 de *L. kunkeei* pudo fermentar la Rafinosa D y Fhon2 no pudo, y en que Fhon2 pudo fermentar la Trehalosa D, el gluconato de potasio y el 5-cetogluconato de potasio, y la cepa tipo YH-15 de *L. kunkeei* no pudo. Se evidenció que la cepa bacteriana de acuerdo con la invención que incluye la Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* difiere de la cepa tipo *Lactobacillus kunkeei*.

Se usó el análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) para distinguir Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* de la cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei*. El procedimiento de laboratorio se realizó de acuerdo con Jansson D. S. *et al.*, 2004. *J Med Microbiol.* 53, 293-300, usando el cebador 1254 (5'-CCGCAGCCAA-3'). El resultado de los patrones de RAPD obtenidos con el cebador 1254 se muestra en la Figura 2. Se demostró que el patrón de RAPD de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención que incluye Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* difiere de la cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei*. Las cepas bacterianas idénticas deberían mostrar patrones idénticos en el gel de agarosa en relación con la composición cromosómica bacteriana. La cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei* indicada por el número 1 en la Figura 2 muestra 9 bandas de ADN, y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* indicada por el número 2 muestra 6 bandas de ADN. Las cepas tienen diferentes números de bandas y también diferentes patrones de bandas, lo que significa que difieren en la composición del genoma de ADN completo.

En vista de lo anterior, Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* es una nueva cepa de *Lactobacillus kunkeei* a pesar de la alta similitud del ARNr 16S entre Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* y la cepa tipo mostrada en el árbol filogenético de la Figura 1.

**EJEMPLO 8 - Infección de colmena de abejas**

Se infectó una de las colmenas de abejas con el patógeno de larvas *Paenibacillus larvae*. La infección por este patógeno normalmente conducirá a un desarrollo de la loque americana (AFB). Tras la infección, se colocó la colmena de abejas junto a un campo de flores de frambuesa y árboles de tilo cuyo néctar funciona como un prebiótico para las bacterias de acuerdo con la invención. En este momento, el número de larvas de *P. larvae* comenzó a disminuir desde su máximo registrado de ocho mil millones de UFC por larva, desapareciendo tres semanas después sin que se desarrollara la AFB. Este resultado mostró claramente que las cepas bacterianas de acuerdo con la invención pueden luchar conjuntamente contra este patógeno cuando se alimentan con néctar de flores de frambuesa y de tilo que contienen más fructosa que otros néctares.

**EJEMPLO 9 - Pienso probiótico para abejas y larvas de abeja, otoño.** Se preparó un pienso para abejas para el otoño (época de descanso de las abejas) que constituía bacterias liofilizadas de acuerdo con la invención y una fuente de azúcar mezclando las bacterias con una solución azucarada que contenía fructosa al 19 %, glucosa al 19 %, sacarosa al 37 % y agua al 25 %. La cantidad total de producto usado fue 16 kg/colonia de abejas melíferas, y el producto contenía  $10^5$  de bacterias UFC/g de producto. Se mezclaron los ingredientes y se alimentaron las colonias de abejas con la mezcla en una botella colocada encima de la colonia de abejas. Las abejas ingirieron la solución y la almacenaron en las celdas de su colmena con un sellado de cera.

En una segunda aplicación, se mezclaron las bacterias liofilizadas con 1 kg de miel, conduciendo a una concentración bacteriana de UFC de  $10^7$  por gramo de producto. Se mezcló 1 kg de miel con 13 kg de sacarosa y 14 kg de agua. Este producto tenía un contenido de azúcar del aproximadamente 50 %, como el néctar de las flores, y una UFC bacteriana similar a la del estómago de miel. Se dejó reposar la solución de azúcar durante un día antes de administrarla a las abejas. De esta manera, las bacterias liofilizadas tuvieron la oportunidad de activarse, y comenzar a multiplicarse y producir metabolitos y bacteriocinas beneficiosos antes de su uso. La solución de azúcar no fermentó con levadura, como suele ocurrir cuando se usan soluciones de azúcar sin bacterias añadidas. Al usar miel en la solución de azúcar se obtuvieron varias ventajas. En primer lugar, las abejas estaban más ansiosas por consumir la solución de azúcar que la sacarosa pura. En segundo lugar, la miel contiene componentes adicionales tales como minerales, vitaminas y proteínas.

**EJEMPLO 10 - Estudio de conservación**

Se mezclaron  $4 \times 10^7$  UFC de cepa Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* con 200 ml de agua, 5 ml de zumo de limón y 17 ml de miel. El agua con miel se dejó en el refrigerador durante tres semanas. Tras tres semanas, el agua tenía un sabor fresco, sin sabor a fermentación ni a bacterias. La cantidad de *Lactobacillus kunkeei* se duplicó, y no se pudieron detectar levaduras.

**EJEMPLO 11- Estudio de resistencia al azúcar**



Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención y las cepas disponibles de productos comerciales DSM 20079 de *L. bulgaricus*, JCM 1134 de *L. casei*, DSM 20016 de *L. reuteri*, DSM 10140 de *B. animalis* subesp. *Lactis* y DSM 20081 de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* se mezclaron en viales separados con una solución de azúcar que contenía sacarosa al 65 % y agua al 35 %. La concentración final de azúcar fue del 65 %. Los viales se incubaron a 22 °C y se realizaron recuentos viables. Los resultados demostraron que las cepas bacterianas de acuerdo con la invención eran mucho más resistentes al azúcar (tras 8 días, todas eran viables en números de UFC de entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>5</sup> UFC por ml) que las cepas de productos disponibles en el mercado (todas murieron tras 8 días), véase la Figura 3.

Se realizó un segundo ensayo repitiendo el primero, pero con una solución de azúcar diferente, que contenía fructosa al 19 %, glucosa al 19 %, sacarosa al 37 % y agua al 25 %. En esta solución, la concentración de azúcar fue del 70 %, que es una concentración de azúcar muy alta para las bacterias. De nuevo, los resultados demostraron que las cepas bacterianas de acuerdo con la invención eran mucho más resistentes al azúcar (tras 8 días, todas eran viables en números de UFC de entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>6</sup> UFC por ml) que las cepas de productos disponibles en el mercado (todas murieron tras 8 días), véase la Figura 4.

**EJEMPLO 12- Estudio de la inhibición de microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos**

Se exploraron las cepas bacterianas de acuerdo con la invención frente a la levadura deteriorante de alimentos y de la miel *Saccharomyces cerevisiae*, las bacterias deteriorantes de alimentos *Pseudomonas fluorescens* y *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactobacillus sakei*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* y los patógenos humanos *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, en los que también se representa *Pseudomonas* como género, en este caso como *Pseudomonas fluorescens*, incluso si esta especie no es un patógeno, y el patógeno de la abeja melífera *Paenibacillus larvae*. Las cepas bacterianas de acuerdo con la invención se cultivaron en caldo MRS que contenía L-cisteína al 0,5 % (excepto Fhon2, que se cultivó en caldo MRS que contenía fructosa al 2 %) anaeróticamente a 35 °C durante tres días, y se obtuvieron crecimientos continuos por separado en el centro de las placas de agar MRS que contenían L-cisteína al 0,5 % (excepto Fhon2, que se cultivó en placas de agar con zumo de tomate) de forma anaeróbica a 35 °C durante un día. Las cepas de ensayo de la Tabla 4 se cultivaron en medio líquido, de acuerdo con la Tabla 4, y luego se mezclaron con medio nuevo que contenía agar al 0,8 %) a una temperatura de 42 °C. Se mezclaron los medios y las bacterias, y se vertieron sobre las placas con las cepas bacterianas cultivadas de acuerdo con la invención. A continuación, se incubaron las placas a 35 °C durante 3 días y se analizaron las zonas de inhibición, en las que el diámetro de la zona se midió en cm.

**Tabla 4: Inhibición de microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos**

Cepa	Medios de cultivo	Bin2	Hma2	Hon2	Hma3	Hma8	Bin7	Bma6	Biut2	Bma5	Fhon2	Hma11
<i>S. cerevi.</i>	MRS		* 2 cm			2 cm			2 cm	2 cm		
<i>P. fluoresc.</i>	BHI	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	1 cm	
<i>E. coli</i>	BHI	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	
<i>Cl. tyrobut.</i>	RCM	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm		1 cm	1 cm	
<i>S. aureus</i>	BHI	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	2 cm	1 cm	2 cm	2 cm	1 cm	
<i>E. faecalis</i>	M17		1 cm			1 cm			1 cm	1 cm		
<i>L. sakei</i>	MRS		1 cm			1 cm			1 cm	1 cm	1 cm	
<i>B. cereus</i>	BHI										1 cm	
<i>L. innocua</i>	M17										1 cm	
<i>P. larvae</i>	MYPGP	1 cm	4 cm	2 cm	2 cm	4 cm	3 cm		3 cm	4 cm	2 cm	2 cm

\*...cm representa la zona de inhibición alrededor de las cepas bacterianas de acuerdo con la invención cuando se cultivaron encima las bacterias de ensayo.

Los resultados demostraron claramente la inhibición de las bacterias patógenas y deteriorantes de alimentos con, más frecuentemente, una zona de 2,0 cm, lo que significa que las bacterias mueren o no pueden crecer en esta zona esférica alrededor de los las cepas bacterianas de acuerdo con la invención. Cuando se ensayó la cepa Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* y la cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei* para determinar la inhibición del patógeno de la abeja *Paenibacillus larva*, solo Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* inhibió el patógeno (Tabla 4), pero la cepa tipo de *Lactobacillus kunkeei* (no mostrada en la Tabla 4) no inhibió a *P. larvae* en absoluto. Esto da lugar a una nueva

evidencia de que Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* es una nueva cepa de *Lactobacillus kunkeei*.

**EJEMPLO 13 - Estudio de administración**

5 Se administraron las cepas bacterianas de acuerdo con la invención por vía oral a diez individuos sanos de edades diferentes con ninguna infección ni enfermedades intestinales. Tuvieron un período de lavado de una semana antes de la administración, cuando no se consumieron productos probióticos. La administración se realizó diariamente durante 10 días. La bebida ingerida contenía bacterias preparadas a partir de cultivos recién preparados con una concentración equivalente a aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC por cepa, 20 ml de leche de avena. Los voluntarios  
10 entregaron muestras fecales que se tomaron directamente antes de la administración, tras 10 días de administración y 7 días después de finalizarse la administración. Se diluyó un gramo de heces en serie y se sembró en agar Rogosa. Se escogieron al azar seis colonias de muestras fecales y se escogieron seis de acuerdo con el aspecto visual. La identificación de aislados se realizó mediante RAPD.

15 **EJEMPLO 14 - Miel sintética**

Se fabricó miel sintética añadiendo diversas cantidades de las cepas de la Tabla 1 a una solución de azúcar que contenía los azúcares fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y melecitosa (procedentes, por ejemplo, de la remolacha azucarera, caña de azúcar o jarabe de maíz rico en fructosa) a diversas concentraciones finales como en los néctares de flores naturales de entre el 7 y el 80 %, junto con aminoácidos, vitaminas, minerales y agua. Las  
20 bacterias fermentaron el producto durante 3 días a 35 °C. El contenido de agua se redujo durante el proceso por debajo del 18 % como en la miel natural.

**EJEMPLO 15 - Pan sintético de abejas**

25 Se fabricó pan sintético de abejas mezclando miel sintética, fabricada como en el Ejemplo 14 y que contenía las cepas de la Tabla 1, y polen de flores o harina de soja, horneando el pan de abeja similar al natural producido por las abejas melíferas a partir de la miel y el polen.

30 **EJEMPLO 16 - Miel sintética para el tratamiento de heridas**

Se fabricó miel sintética como en el Ejemplo 14, que contenía las cepas de la Tabla 1 para su aplicación sobre heridas, etc. descrita en el apartado de productos medicinales. La miel sintética se puede usar esterilizada o con bacterias viables.

35 **Listado de secuencias**

<110> OLOFSSON, Tobias VASQUEZ, Alejandra

40 <120> NUEVAS BACTERIAS AISLADAS DE LA MIEL FRESCA O DEL TRACTO PRODUCTOR DE MIEL DE ABEJAS MELÍFERAS

<130> PC-EP-21044437

45 <140> EP0875931.8  
<141> 30-04-2009

<150> SE 0701050-7  
<151> 03-05-2007

50 <150> US 30/916809  
<151> 09-05-2007

<160> 5

55 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 20

60 <212> ADN  
<213> *Escherichia coli*

<220>  
<221> base modificada

65 <222> (11)..(11)  
<223> I

ES 2 683 334 T3

5 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (12)..(12)  
 <223> I  
  
 <400> 1  
 agagtttgat nntggctcag 20  
  
 10 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*  
  
 15 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (4)..(4)  
 <223> I  
  
 20 <400> 2  
 cggntacctt gttacgact 20  
  
 25 <210> 3  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> cebador universal  
  
 <400> 3  
 gtaaacgac ggccag 16  
  
 35 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> cebador universal  
  
 <400> 4  
 caggaaacag ctatgac 17  
  
 45 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 5  
 ccgcagccaa 10  
  
 55

## REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana aislada del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, aislada del tracto productor de miel de al menos una abeja, consistiendo el tracto productor de miel de una abeja en el tronco, la boca, el esófago y el saco de miel, y cepa que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del deterioro de los alimentos y de organismos patógenos, siendo la cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 cepa Biut2 de *Lactobacillus* (LMG P-24094), cepa Hma2 de *Lactobacillus* (LMG P-24093), cepa Hma8 de *Lactobacillus* (LMG P-24092), cepa Bma5 de *Lactobacillus* (LMG P-24090), cepa Hon2 de *Lactobacillus* (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007,
- 10 la cepa Bin7 de *Bifidobacterium* (LMG P-23986), la cepa Hma3 de *Bifidobacterium* (LMG P-23983), la cepa Bin2 de *Bifidobacterium* (LMG P-23984), la cepa Bma6 de *Bifidobacterium* (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007, y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 28 de abril de 2008.
- 15
2. Cepa bacteriana de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tracto productor de miel de una abeja no incluye las tripas ni el intestino.
3. Cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la cepa tiene la capacidad de ser viable durante al menos 8 días en una solución de azúcar al 65 % en peso, preferentemente durante 8 días en una solución de azúcar al 70 % en peso, cuando la cepa bacteriana se mezcla con una solución de azúcar que contiene sacarosa al 65 % y agua al 35 %, y se incuba a 22 °C.
- 20
4. Una composición que comprende una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25
5. Composición de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una fuente de azúcar, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en miel, azúcar, fructosa, sacarosa, dextrina, maltosa o glucosa.
6. Composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un vehículo y/o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 30
7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, que es una suspensión, un gel, una crema, un polvo o una cápsula.
- 35
8. Producto farmacéutico que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en forma de apósito, vendaje o pulverizado.
9. Producto alimentario o pienso que comprende una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 40
10. Producto alimentario o pienso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho producto es un pienso para abejas.
11. Método de producción de miel sintética que comprende añadir al menos una cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 a una fuente de azúcar, en donde se permite que dicha al menos una cepa fermente al menos parte de una fuente de azúcar.
- 45
12. Cepa bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en la preparación de un producto medicinal, un producto alimentario, una bebida o una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar infecciones o enfermedades gastrointestinales.
- 50
13. Un método de aislamiento de una cepa bacteriana del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, estando dicha cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: cepa Biut2 de *Lactobacillus* (LMG P-24094), cepa Hma2 de *Lactobacillus* (LMG P-24093), cepa Hma8 de *Lactobacillus* (LMG P-24092), cepa Bma5 de *Lactobacillus* (LMG P-24090), cepa Hon2 de *Lactobacillus* (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007, la cepa Bin7 de *Bifidobacterium* (LMG P-23986), la cepa Hma3 de *Bifidobacterium* (LMG P-23983), la cepa Bin2 de *Bifidobacterium* (LMG P-23984), la cepa Bma6 de *Bifidobacterium* (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007, y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 28 de abril de 2008, que comprende:
- 60
- a) la separación del tracto productor de miel de una abeja, separándose el tracto productor de miel pasado el esófago y antes del proventrículo para evitar la contaminación procedente de las tripas o del intestino, y agitar el tracto en un medio estéril;
- b) el cultivo bacteriano de la muestra de a) en un medio adecuado;
- 65 c) el cultivo puro y el aislamiento de la/s cepa/s bacteriana/s obtenidas en b) en un medio adecuado;
- d) la evaluación de la capacidad de la/s cepa/s de inhibir el deterioro de los alimentos y microorganismos

patógenos.

14. Cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste en: cepa Biut2 de *Lactobacillus* (LMG P-24094), cepa Hma2 de *Lactobacillus* (LMG P-24093), cepa Hma8 de *Lactobacillus* (LMG P-24092), cepa Bma5 de *Lactobacillus* (LMG P-24090), cepa Hon2 de *Lactobacillus* (LMG P-24091), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 3 de abril de 2007, cepa Bin7 de *Bifidobacterium* (LMG P-23986), cepa Hma3 de *Bifidobacterium* (LMG P-23983), cepa Bin2 de *Bifidobacterium* (LMG P-23984), cepa Bma6 de *Bifidobacterium* (LMG P-23985) y Fhon2 de *Lactobacillus kunkeei* (LMG P-23987), siendo dichas cepas depositadas en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 15 de enero de 2007, y Hma11 (LMG P-24612) depositada en la Colección de Bacterias BCCM/LMG de Bélgica el 28 de abril de 2008.

