



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CAMPECHE

**POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD
AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO**

**MELIPONINOS DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE
LOS PETENES Y DIVERSIDAD MICROBIANA DE
Scaptotrigona pectoralis Y *Frieseomelitta nigra***

SILVIA CAB BAQUEIRO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2020



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

MÉXICO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO VERACRUZ CÓRDOBA-CAMPECHE

CAMPUS CAMPECHE
SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN

CARTA CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Silvia Cab Baqueiro, Alumno (a) de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesora Consejera Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis: **Melponinos de la Reserva de la Biósfera de los Petenes y diversidad microbiana de *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra***, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, el consejero de tesis y el que suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las tres partes, por ello comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 10 de febrero de 2020

Silvia Cab Baqueiro
Estudiante

Vc. Bo.
Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz
Profesora Consejera

La presente tesis, titulada: Meliponinos de la Reserva de la Biósfera de los Petenes y diversidad microbiana de *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*, realizada por la alumna: Silvia Cab Baqueiro, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

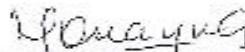
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz

ASESORA:



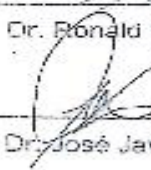
Dra. Mónica Osnaya González

ASESOR:



Dr. Ronald Ferrera Cerrato

ASESOR EXTERNO:



Dr. José Javier Quezada Euán

Siinohac, Champotón, Campeche, 21 de enero de 2020

MELIPONINOS DE LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS PETENES Y
DIVERSIDAD MICROBIANA D *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*

M. C. Silvia Cab Baqueiro
Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

Las abejas sin aguijón (ASA) o meliponinos son abejas nativas sociales que, se encuentran distribuidas principalmente en selvas tropicales y subtropicales y son considerados vitales para la conservación de estos ecosistemas. Estas abejas establecen asociaciones con una gran diversidad de microorganismos (microbiota) de gran importancia para su sistema inmunitario y digestivo. En México se reporta que la mayor diversidad de ASA se encuentra en el sureste. En el estado Campeche a pesar de ser el segundo estado con mayor extensión de Áreas Naturales Protegidas (ANP) en México, existen pocos reportes de muestreos de especies de ASA, y ninguno en cuanto su microbioma. Por tal razón, este trabajo tuvo como objetivo determinar la densidad de nidos de ASA presentes en la Reserva de la Biosfera de los Petenes y la diversidad microbiana asociada a *Frieseomelitta nigra* y *Scaptotrigona pectoralis*. Para ello, se realizaron muestreos mediante transectos lineales en dos sitios dentro de la reserva colindantes con dos municipios (Hecelchakan y Calkiní), para la búsqueda de nidos. La identificación de las ASA se realizó usando claves taxonómicas. De igual forma, se tomó el registro de las especies arbóreas que sirvieron como sustrato para la nidificación. Asimismo, se realizó la identificación de la comunidad microbiana de las especies de *S. pectoralis* y *F. nigra*, así como la evaluación de su funcionalidad bioquímica. Como resultado de nuestro estudio, se identificaron ocho especies de abejas sin aguijón entre ellas, *Cephalotrigona zexmeniae*, *Frieseomelitta nigra*, *Lestrimellita niitkib*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Plebeia frontalis*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Trigona fulviventris*. El mayor número de nidos localizados, perteneció a las especies *F. nigra* (n=23) con un 41% y *S. pectoralis* (n=16) con un 29%. La especie

arbórea utilizada con mayor frecuencia para anidación correspondió a *Crescettia cujete* debido a su predominancia en el hábitat. Se encontró una densidad de nidos por hectárea, 2.15 en el sitio Hecelchakán y de 0.19 en el sitio de Calkiní. El análisis microbiológico de la microbiota interna y externa permitió identificar 42 cepas bacterias en *S. pectoralis* y *F. nigra*, pertenecientes a diez géneros tales como, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sinorhodobacter* y *Staphylococcus*. De igual manera, se identificaron 3 cepas de la levadura a *Candida metapsilosis*. Se encontraron cepas de *Bacillus* con importantes actividades aminolíticas, celulolíticas, lipolíticas, proteolíticas, solubilización de fosfato y ácidos orgánicos. La actividad lipolítica (47%) fue la actividad que estuvo presente en un mayor número de bacterias, seguido por la actividad solubilizadora de fosfato (44%) y la producción de ácidos orgánicos (29%). La especie *Pantoea anthophila* presentó importante actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato. Estos resultados indican que los microorganismos podrían estar desempeñando un papel importante en la producción de enzimas que favorecen la digestión de sus alimentos o formación de materiales para el nido.

Palabras clave: Meliponini, microbiota interna y externa, densidad de nidos, actividad enzimática.

STINGLESS BEES OF THE PETENES BIOSPHERE RESERVE AND MICROBIAL DIVERSITY OF *Scaptotrigona pectoralis* AND *Frieseomelitta nigra*

M. C. Silvia Cab Baqueiro

Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

Stingless bees (SB) or meliponini are social native bees which are mainly distributed in tropical and subtropical forests, they are vital for the conservation of these ecosystems. These bees are associated with a wide diversity of microorganisms of importance for their immune and digestive system. In Mexico, it is reported that the greatest diversity of SB is found in the southeast. In the Campeche state, despite being the second largest state of Protected Natural Areas (ANP), there are few reports of identification of SB species, and none as for their associated microorganisms. For this reason, this work aimed to determine the density of SB nests present in the Petenes Biosphere Reserve and the microbial diversity associated with *Frieseomelitta nigra* and *Scaptotrigona pectoralis*. For nest searches, linear transects were established at two sampling areas (Hecelchakan and Calkiní). The found species were identified using taxonomic keys. They were registered the tree species, where the nests were localized. The identification of associated microorganisms to the species *S. pectoralis* and *F. nigra* was carried out; as well as the evaluation of their biochemical functionality. In our study, eight species of SB were identified, *Cephalotrigona zexmeniae*, *Frieseomelitta nigra*, *Lestrimellita niitkib*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Plebeia frontalis*, *Scaptotrigona pectoralis* and *Trigona fulviventris* were identified. Of which, the largest number of nests located, belonged to *F. nigra* (n = 23) with 41% of the total nests and *S. pectoralis* (n = 16) with 29%. In addition, there was the absence of *M. beecheii*, due to its susceptibility to the conditions of anthropic disturbance that characterized the sampling sites. The tree species most frequently utilized for the nesting of the species corresponded to *Crescentia cujete*, due to its predominance in the habitat. It was found a density of nests per hectare of 2.15 at the Hecelchakán

site and 0.19 at the Calkiní site. The microbiota of 45 strains of associated microorganisms identified from the species *S. pectoralis* and *F. nigra*, were distributed in ten genus tales such as *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sinorhodobacter* and *Staphylococcus*. Similarly, they were identified three strains of yeasts corresponding to a *Candida metapsilosis*. *Bacillus* strains were found with important aminolytic, cellulolytic, lipolytic, proteolytic, phosphorus solubilization and organic acids activities. The largest number of bacteria presented lipolytic activity, followed by phosphate solubilizing activity and organic acid production. The *Pantoea anthophila* species had an important lipolytic, proteolytic and phosphate solubilization activity. These results indicate that the microorganisms could be playing an important role in the production of enzymes that contributed to the digestion of their food or the formation of nest materials.

Keywords: Meliponini, internal and external microorganisms, nest density, enzymatic activity.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el financiamiento para mis estudios de postgrado; así como por el financiamiento para parte de mi investigación mediante el proyecto de Ciencia Básica: SEP-CONACyT 257847 Diversidad de meliponidos, estudio de sus microorganismos asociados y análisis de las propiedades biológicas de sus productos.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, por darme la oportunidad de formar parte de esta institución y a la comunidad COLPOS por su valioso apoyo y amistad.

A la **Línea de Investigación de Innovación y Sustentabilidad Agrícola en el Trópico** del Campus Campeche.

Al **Laboratorio de Fitopatología y Microbiología Agrícola** del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, por su apreciable recibimiento durante la duración del proyecto de investigación.

Al **Laboratorio de Bioprocesos** del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, por su recibimiento para formar parte de él. También a mis amigos de este laboratorio que siempre me apoyaron y me dieron días de convivencia inigualables.

Al **Laboratorio de Microbiología Agrícola** del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por su recibimiento para concluir con el proyecto de investigación.

Al **Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas** del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, por permitirme formar parte de él y por financiar parcialmente la presente investigación.

A la **Dra. Arely Anayansi Vargas Díaz** por su gran apoyo como consejera de mi proyecto de investigación. Muchas gracias por cada día que dedicó a mi formación y por la paciencia demostrada siempre.

A la **Dra. Ma. Mónica Osnaya González** por su valioso apoyo como asesora de tesis y a su disposición de compartir su apreciable conocimiento conmigo.

Al **Dr. Ronald Ferrera Cerrato** por su gran apoyo y motivación como asesor durante la realización del proyecto de investigación.

Al **Dr. José Javier Quezada Euán** por su recibimiento y entera disposición a colaborar con el proyecto de investigación como asesor.

Al **M. en C. Humberto Moo Valle** por compartir su conocimiento taxonómico de abejas sin aguijón y su apoyo en la investigación.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas**, por su caluroso recibimiento en el laboratorio bajo su dirección y por su apoyo incondicional que me impulsó a concluir mi tesis satisfactoriamente.

A la **Sra. Martha**, que apoyó incondicionalmente mi estancia en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas y compartió conmigo sus consejos.

A **Eduardo**, que me brindó su ayuda y conocimiento en laboratorio; así como su invaluable amistad sincera que perdura hasta el día de hoy.

A **Sandra**, mi entrañable amiga con quien compartí horas muy amenas en el laboratorio y nuestro amor por los libros.

A todos **mis compañeros y amigos** del Colegio de Postgraduados.

A **Luis Fernando**, por su amistad incondicional, por compartirme de su conocimiento sin reserva y por provocar muchas risas y pláticas amenas.

A **Mari**, por su amistad sincera e incomparable que la hacen la bella persona que es.

A **Nora**, por brindarme su amistad y compartir su visión de la vida a través de sus refranes.

A **Susy**, por su compañerismo y amistad que me dio grandes enseñanzas.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a **Dios**, porque me ha dado todo y no tengo más qué pedir. Solo puedo agradecerle por permitirme estar donde estoy, por darme la oportunidad de conocer a las personas adecuadas durante el camino y sobre todo por cuidar y llenar siempre de bendición a mi familia.

A **mis padres** que en todo momento impulsaron mi desarrollo académico. En especial a **mi madre** que es mi ejemplo de vida y en agradecimiento le dedico este logro.

A **mi esposo**, por nunca dejar que me riendiera, por animarme a seguir adelante siempre. Por su apoyo incondicional, su gran amor, su compañía y paciencia a lo largo de este proceso.

A **mi pequeña hija**, que es la luz de mis días aún cuando esta todo en oscuridad. Quien me inspira para ser mejor cada día, te dedico este logro a ti, que eres el mejor de los regalos.

A todos aquellos amigos incondicionales que me ayudaron a continuar con este proceso y me dieron grandes enseñanzas. En especial a **Delmi**, por su grata compañía, su amistad única y su tiempo invertido al conocimiento compartido que fue la base para mi investigación.

Contenido

RESUMEN	III
ABSTRACT	V
LISTA DE CUADROS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo general	6
2.1.1 Objetivos específicos.....	6
HIPÓTESIS	7
3.1 Hipótesis general	7
3.1.1 Hipótesis específicas.....	7
LITERATURA CITADA.....	8
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	11
GENERALIDADES DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN	11
1.1 Descripción morfológica de los Meliponinos	11
1.2 Importancia de las abejas sin aguijón.....	13
1.3 La meliponicultura en el sureste mexicano	14
1.4 Principales amenazas de las abejas sin aguijón.....	16
1.5 Aspectos biológicos de las abejas nativas sin aguijón.....	18
1.6 Biología de anidación	20
1.7 Distribución de las abejas sin aguijón.....	22
1.8 Especies reportadas en el estado de Campeche	24
1.9 Taxonomía de abejas nativas sin aguijón.....	25
1.10 Distribución espacial de los nidos de ASA.....	27

ESTUDIO DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A INSECTOS	29
2.1 Microorganismos simbióticos en insectos.....	29
2.2 Microorganismos asociados a meliponinos o abejas sin aguijón	31
2.2.1 Importancia de los microorganismos en las abejas sin aguijón.....	31
2.2.2 Microorganismos aislados de abejas sin aguijón	33
DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO, LA RESERVA DE LA	
BIÓSFERA DE LOS PETENES.....	37
3.1 Generalidades de la RBLP	37
3.1.1 Petén.....	38
3.1.2 Marisma	38
3.1.3 Manglar	39
LITERATURA CITADA.....	40
CAPÍTULO II. DENSIDAD DE NIDOS DE ABEJAS SIN AGUIJÓN EN	
DOS SITIOS DENTRO LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS	
PETENES, CAMPECHE, MÉXICO.....	57
INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y MÉTODOS	60
2.1 Área de estudio.....	60
2.2 Muestreo	62
2.3 Identificación taxonómica.....	63
RESULTADOS	64
3.1 Nidos de especies encontradas de abejas sin aguijón en la Reserva de	
la Biosfera de los Petenes.....	64
3.2 Sustratos de anidación de las abejas sin aguijón	65
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIÓN	73
LITERATURA CITADA.....	74
CAPÍTULO III MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS ABEJAS SIN	
AGUIJÓN <i>Scaptotrigona pectoralis</i> Y <i>Frieseomelitta nigra</i>.....	81
INTRODUCCIÓN	81

MATERIALES Y MÉTODOS	84
2.1 Colecta de las abejas sin aguijón <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Frieseomelitta nigra</i>	84
2.2 Estandarización del proceso de aislamiento de la microbiota interna de las abejas sin aguijón <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Frieseomelitta nigra</i>	85
2.3 Aislamiento y purificación de microorganismos de la microbiota interna y externa de <i>S. pectoralis</i> y <i>F. nigra</i>	87
2.4 Caracterización morfológica de los microorganismos aislados.....	88
2.5 Prueba de KOH.....	88
2.6 Identificación molecular de los microorganismos aislados.....	89
2.7 Determinación de la actividad enzimática de los microorganismos aislados.....	90
RESULTADOS	92
3.1 Aislados obtenidos a partir de la microbiota interna y externa de <i>S.</i> <i>pectoralis</i> y <i>F. nigra</i>	92
3.2 Caracterización micro y macroscópica de los aislados.....	93
3.3 Identificación molecular de los microorganismos aislados.....	98
3.4 Prospección de la actividad funcional de los microorganismos aislados	103
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIÓN	114
LITERATURA CITADA.....	115

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Hábitos de anidación de algunas especies de abejas sin aguijón, modificado de Roubik, 2006.	21
Cuadro 2. Comportamiento defensivo de algunas especies de abejas sin aguijón, modificado de Roubik, 2006.	22
Cuadro 3. Especies de abejas sin aguijón reportados en México y en el estado de Campeche (modificado de Ayala <i>et al.</i> , 2013).....	24
Cuadro 4. Microorganismos reportados en diferentes tejidos y productos de abejas sin aguijón.....	36
Cuadro 5. Número y densidad de nidos por especie de abejas sin aguijón localizados en los sitios de muestreo establecidos dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.	64
Cuadro 6. Especies de árboles usados como sitios de establecimiento de colonias de Abejas Sin Aguijón, en la Reserva de la Biósfera de los Petenes para el sitio Hecelchakán.....	66
Cuadro 7. Frecuencia de nidos localizados en ruinas de hacienda localizada en la Reserva de la Biósfera de los Petenes.....	67
Cuadro 8. Ubicación geográfica de los nidos muestreados para el aislamiento de microorganismos asociados a las especies de abejas sin aguijón <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Frieseomelitta nigra</i> , en la Reserva de la Biosfera de los Petenes.....	84

Cuadro 9. Tratamientos empleados para estandarizar la desinfestación de las abejas <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Frieseomelitta nigra</i> de la Reserva de la Biosfera de los Petenes, para el aislamiento de sus microorganismos internos asociados, con base en estudios en otros insectos.	86
Cuadro 10. Cepas de microorganismos identificados de <i>F. nigra</i> y <i>S. pectoralis</i> de la RBLP, Campeche.....	99
Cuadro 11. Evaluación de las actividades bioquímicas de 41 cepas aisladas de <i>F. nigra</i> y <i>S. pectoralis</i> de la RBLP, Campeche.	106

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Componentes de la morfología externa de ASA obrera de *Meliponula bocandei*. Modificado de Kwapong *et al.*, 2010..... 11
- Figura 2.** Distribución pantropical de abejas sin aguijón (Hrncir *et al.*, 2016). 23
- Figura 3.** Meliponinos reconocidos actualmente según base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (2019). 26
- Figura 4.** Ubicación del área de estudio. La Reserva de Biosfera de los Petenes, sitio de muestreo, Hecelchakán. 61
- Figura 5.** Ubicación del área de estudio. La Reserva de Biosfera de los Petenes, sitio de muestreo, Calkiní. 61
- Figura 6.** Entradas de nido en sitio Hecelchakán. A: Guardianas en entrada de nido de *Scaptotrigona pectoralis* en árbol de Chaká (*B. simaruba*), B: Centinela en entrada de nido de *Frieseomelitta nigra* en árbol de Jícara (*C. cujete*)..... 67
- Figura 7.** Colecta de abejas para aislamiento de microbiota interna y externa, en la entrada de nido de la especie de ASA *Frieseomelitta. nigra*. 85
- Figura 8.** Números totales de morfotipos aislados de la microbiota interna y externa de las ASA *F. nigra* y *S. pectoralis* de la RBLP, cultivadas en los medios Luria Bertani=LB, Czapek Dox=CZ y Extracto de Malta=EM. 93

Figura 9. Árbol filogenético de la identificación de los aislamientos de la microbiota interna	101
Figura 10. Árbol filogenético de los aislamientos identificados de la microbiota externa.	102

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las abejas son uno de los grupos de insectos más diversos (Araújo *et al.*, 2004). Son de vital importancia por su desempeño como polinizadores, principalmente aquellas especies consideradas como nativas; cuyo papel es clave en el mantenimiento funcional de los ecosistemas (Hung *et al.*, 2018). Entre las abejas nativas se encuentran los meliponinos o abejas sin aguijón (ASA), las cuales son abejas sociales que se distribuyen principalmente en selvas tropicales y subtropicales y son consideradas vitales para la conservación de estos ecosistemas (González-Acereto, 2012).

De las 600 especies de ASA conocidos en el mundo (Lavinás *et al.*, 2018), en México se han registrado un total de 46 especies, 13 de ellas son reconocidas como endémicas del territorio mexicano (Ayala *et al.*, 2013). Según lo reportado por Ayala *et al.*, (1996, 1998) y Yáñez-Ordoñez (2008) la mayor diversidad de estas abejas se presenta en el sureste de México. Esta región cuenta con hábitats con alta diversidad de ecosistemas que permiten el establecimiento de nidos de ASA (Yurrita *et al.*, 2017). De Las entidades federativas que conforman la región sursureste de México (Chiapas, Campeche, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán), Campeche ocupa el primer lugar de superficie protegida, con 23 421.18 km equivalentes al 41.2% del área total del estado. En la Península de Yucatán, solo se ha reportado un total de 17 especies de meliponinos, con un registro de 11 especies en el estado de Campeche, entre las que se incluyen los géneros *Melipona*, *Trigona*, *Scaptotrigona*, *Nannotrigona*, *Partamona* y *Frieseomelitta* (Ayala *et al.*, 2013). El número de especies en el estado de Campeche podría ser aún

mayor ya que cuenta con áreas naturales protegidas como lo es la Reserva de la Biosfera de los Petenes (RBLP) con una extensión territorial de 2 828.58 km². En esta reserva se localizan ciertos ambientes denominados Petenes que son islotes de vegetación diversa con alta heterogeneidad que permiten la existencia de múltiples hábitats por lo que pueden sostener una elevada biodiversidad global, incluyendo diferentes especies de insectos (Rosano-Hernández, 2011) como las abejas sin aguijón (ASA). Pat-Fernández *et al.*, (2018) reportaron en comunidades aledañas a la Reserva de la Biósfera de los Petenes ocho especies de ASA entre las que se encuentra *Cephalotrigona zexmeniae*, *Frieseomelitta nigra*, *Lestrimellita niitkib*, *Melipona beecheii*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Trigona fulviventris*. Por lo tanto, esta área natural protegida podría albergar nidos de especies de ASA aún no reportados para el estado de Campeche.

Asimismo, las especies de ASA, al igual que la mayoría de los insectos, durante su recolecta de polen y néctar, están en contacto con una gran variedad de microorganismos con los que establecen asociaciones diversas (Brune, 2014). Se ha demostrado que, las ASA, se asocian con bacterias, hongos y levaduras para poder satisfacer necesidades como la nutrición durante el desarrollo de larvas y también en el mantenimiento de sus nidos (Vit *et al.*, 2013). Por ejemplo, se sabe que la conversión del polen en pan de abeja es el resultado de la acción microbiana, donde básicamente ocurre una fermentación ácido-láctica por acción de bacterias y levaduras, con actividad proteolítica y lipolítica y otros procesos enzimáticos (del Risco-Rios *et al.*, 2012). Asimismo, los microorganismos pueden proporcionar a sus

hospederas aminoácidos esenciales, vitaminas, nutrientes y enzimas que facilitan la digestión y la obtención de energía (Lee *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2013). Por lo tanto, los microorganismos son de gran importancia para la salud del sistema inmunitario, digestivo y del bienestar de las abejas (Anderson *et al.*, 2011).

A pesar de esto, existen pocas investigaciones en el estado de Campeche sobre muestreos de nidos de abejas sin aguijón (ASA) para determinar las especies presentes y ninguno con respecto a sus microorganismos asociados a las especies nativas como las ASA. Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue determinar la densidad de nidos de abejas sin aguijón presentes en la Reserva de la Biosfera de los Petenes y la diversidad microbiana asociada a *Frieseomelitta nigra* y *Scaptotrigona pectoralis*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las abejas sin aguijón (ASA) son insectos eusociales importantes por los servicios que ofrecen a los ecosistemas. Las ASA requieren de dos recursos vitales, los florales para su alimentación y sitios para anidar. Su desempeño está limitado por la diversidad y continuidad de estos recursos. En el trópico mexicano la composición de las especies de ASA va cambiando de acuerdo con la vegetación. Las áreas naturales del estado de Campeche forman parte de una gran diversidad de ecosistemas y con una flora característica, por ejemplo, la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP), en la cual, los estudios sobre densidad de nidos y especies de abejas sin aguijón no existen y podrían albergar especies de ASA aún no reportados.

Estas abejas establecen asociaciones con bacterias, hongos y levaduras los cuales pueden participar en los procesos fermentativos de miel y polen, en los materiales de anidación y en las celdas de cría, además de favorecer el crecimiento, desarrollo y salud de las mismas. Asimismo, la diversidad microbiana asociada a las ASA está determinada por la interacción con los diferentes recursos que obtienen de los ecosistemas, aquellos que usan para su alimentación y materiales para construcción y protección de sus nidos, por lo que los hábitats localizados dentro de esta reserva pueden influir en la diversidad microbiana asociada a las especies *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*.

Con base en lo anterior, este trabajo proporciona conocimiento sobre la densidad de nidos de ASA dentro de la Reserva de la Biosfera de los Petenes y los

microorganismos asociados a dos especies de ASA, e inicia con aspectos funcionales de los microorganismos asociados a las ASA, desde un punto de vista bioquímico, lo que permitirá continuar con estudios fisiológicos y nutrimentales en estos insectos.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la densidad de nidos de abejas sin aguijón (ASA) en la Reserva de la Biosfera de los Petenes (RBLP) y la diversidad microbiana asociada a *Frieseomelitta nigra* y *Scaptotrigona pectoralis*.

2.1.1 Objetivos específicos

- Identificar las especies de ASA presentes y la densidad de nidos en dos sitios dentro de la (RBLP), colindantes con dos municipios del estado de Campeche, México.
- Identificar la microbiota interna y externa cultivable asociada a las especies de ASA, *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*.
- Evaluar la funcionalidad enzimática de los aislados obtenidos a partir de la microbiota interna y externa de *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*.

HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general

La Reserva de la Biósfera de los Petenes presenta una alta densidad de nidos de diferentes especies de abejas sin aguijón (ASA), con microorganismos característicos de su hábitat.

3.1.1 Hipótesis específicas

1. La Reserva de la Biósfera de los Petenes presenta una alta densidad de nidos con especies de ASA aún no reportados para el estado de Campeche.
2. La diversidad microbiana interna y externa asociada a *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*, depende la especie de ASA analizada.
3. La funcionalidad enzimática de los aislados de la microbiota interna y externa de *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*, son diferentes en cada especie.

LITERATURA CITADA

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., & DeGrandi-Hoffman, G. 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(4), 431.

Araújo, E. D., Costa, M., Chaud-Netto, J., y Fowler, H. G. (2004). Body Size and Flight Distance in Stingless Bees (Hymenoptera: Meliponini): Inference of Flight Range and Possible Ecological Implications. *Brazilian Journal of Biology*, 64(3B), 563-568

Ayala, R., Griswold, T. L. y Bullock, S. H. 1998. Las abejas nativas de México. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (Eds.), *Diversidad biológica de México, orígenes y distribución* (pp. 179–225). México D.F.: Instituto de Biología, UNAM. Oaxaca.

Ayala, R., Griswold, T. L. y Yanega, D. 1996. Apoidea (Hymenoptera). En J. Llorente-Bousquets, A. N. García-Aldrete y E. González-Soriano (Eds.), *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento* (pp. 423–464). México D.F.: UNAM/ Conabio

Ayala, R., Gonzalez, V.H., Engel, M.S., 2013. Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey*. Springer New York, New York, NY, pp. 135–152.

Brune, A., 2014. Symbiotic Digestion of Lignocellulose in Termite Guts. *Nature Reviews Microbiology* 12, 168–180.

del Risco-Ríos, C. A., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V. P., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y., y García-Neninger, R. 2012. Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(1), 17-21.

González-Acereto, J. A. 2012. La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrobiencias*, México, (1), 34-41.

Hung, K. L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., y Kohn, J. R. 2018. The Worldwide Importance of Honeybees As Pollinators in Natural Habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870), 2017-2140.

Lavinas, F. C., Macedo, E. H. B., Sá, G. B., Amaral, A. C. F., Silva, J. R., Azevedo, M. M., y Rodrigues, I. A. 2018. Brazilian Stingless Bee Propolis Aand Geopropolis: Promising Sources of Biologically Active Compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, 29(3), 389-399.

Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., y Newton, I. L. 2015. Saccharide Breakdown and Fermentation by the Honey Bee Gut Microbiome. *Environmental microbiology*, 17(3), 796-815.

Newton, I.L.G., Sheehan, K., Lee, F.J., Horton, M.A., and Hicks, R.D. 2013. Invertebrate Systems for Hypothesis Driven Microbiome Research. *Microbiome Science Med* 1: 1–9.

Pat-Fernández, L. A., Anguebes Franceschi, F., Pat Fernández, J. M., Hernández Bahena, P., y Ramos Reyes, R. 2018. Condición y perspectivas de la

meliponicultura en comunidades mayas de la reserva de la biósfera Los Petenes, Campeche, México. *Estudios de cultura maya*, 52, 227-254.

Rosano-Hernández, 2011. Los ecosistemas de Campeche y sus recursos microbianos. En *Recursos genéticos microbianos en la Zona Golfo Sureste de México.*, Marcela Gamboa Angulo y Rafael Rojas Herrera. ed. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM) del Sistema de Agricultura, Gganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)., Ed. México.

Vit, P., Pedro, S.R., Roubik, D. (Eds.), 2013. *Pot-Honey*, Texto original: *A Legacy of Stingless Bees: Un legado de abejas sin aguijón*. Springer-Verlag, Nueva York.

Yáñez-Ordóñez, O., Trujano-Ortega, M. y Llorente-Bousquets, J. 2008. Patrones de distribución de las especies de la tribu Meliponini (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) en México. *Interciencia*, 33, 41–45.

Yurrita, C. L., Ortega-Huerta, M. A., y Ayala, R. 2017. Distributional analysis of *Melipona* stingless bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation. *Apidologie*, 48(2), 247-258.

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

GENERALIDADES DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN

1.1 Descripción morfológica de los Meliponinos

Las abejas de la tribu Meliponini pertenecen a los corbiculados de la familia Apidae. Son conocidas como abejas sin aguijón (ASA). Este grupo de abejas es más diverso en especies que las abejas melíferas. No obstante, ambos son eusociales (Nates-Parra, 2001) aunque difieren en morfología y comportamiento (Quezada-Euán, 2005a).

Las abejas sin aguijón son reconocidas por su pequeño tamaño pequeño que va desde 1.8 mm hasta 1.5 cm, sus dos pares de alas membranosas con venación reducida, sus ojos compuestos sin pilosidad y, sobre todo, por su aguijón atrofiado. Estas son estructuras morfológicas características, que facilitan su desempeño en los sistemas naturales que habitan (Michener, 2000). En la Fig. 1, se muestra como ejemplo, la morfología de la ASA *Meliponula bocandei*.

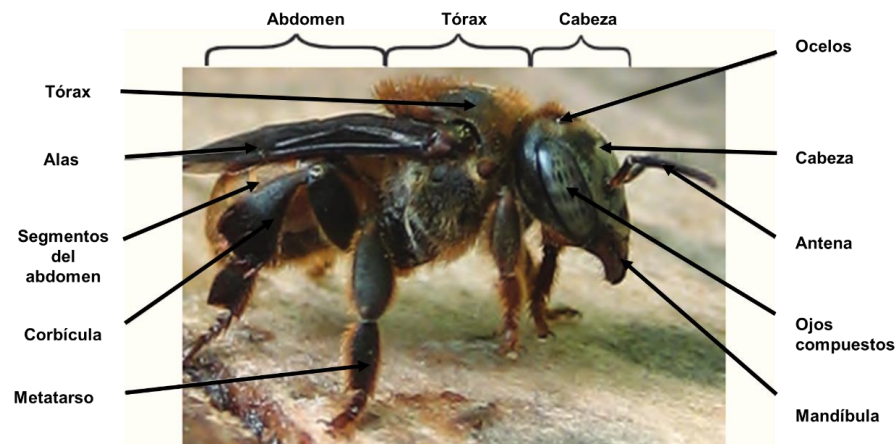


Figura 1. Componentes de la morfología externa de ASA obrera de *Meliponula bocandei*. Modificado de Kwapong *et al.*, 2010.

Para llevar a cabo sus actividades de forrajeo, transporte de polen, cera, resinas y materiales para construcción de sus nidos, la mayoría de las abejas sin aguijón ASA hembra, hacen uso de unas estructuras localizadas en sus patas traseras, las cuales se denominan corbículas (Camargo *et al.*, 2000, Michener, 2013). En las ASA el margen interno de la corbícula incluye una estructura en forma de peine con cerdas rígidas, llamado penicillium que es primordial para la recolección de polen y como parte de las características que permiten la identificación de las ASA. No todas las ASA usan polen como fuente de alimento, algunas especies, por ejemplo del género *Trigona*, son necrófagas por lo que se cree que la pérdida de corbícula está asociada a este comportamiento (Camargo y Roubik, 1991). Esta estructura también está ausente en los géneros *Hypotrigona*, *Lestrimellita* y *Cleptotrigona* (Ndungu *et al.*, 2018, Quezada-Euán, 2018).

Las ASA poseen fuertes mandíbulas que emplean para la defensa y protección de su colonia ante los predadores (Efin *et al.*, 2019). Sus partes bucales, forman una estructura en forma de lengua y a través de ella las abejas toman el alimento líquido. Esta consiste en tres segmentos, uno basal, que contiene las cardinas maxilares, el medio, que contiene el maxilar estípites y el prementum labial (Michener, 2007).

Asimismo, los meliponinos también pueden ser diferenciados de todas las demás abejas por la falta o sutilidad de las venas cruzadas submarginales y la segunda vena recurrente en el ala anterior (Michener, 2013).

1.2 Importancia de las abejas sin aguijón

El transporte del polen de una flor a otra es efectuado por diferentes agentes, en particular el viento y los insectos. Se estima que más del 75% de las 250,000 especies de plantas con flores, incluidos cultivos que constituyen el 35% del suministro mundial de alimentos, son polinizadas por insectos (Klein *et al.*, 2007). Adicionalmente, las abejas son insectos que pueden utilizarse como indicadores de conservación del hábitat (Reyes-Novelo *et al.*, 2009; Winfree *et al.*, 2007). Esto debido a la estrecha relación que mantienen con la vegetación, como consecuencia de su dieta compuesta mayormente de polen y néctar; por lo que deben visitar una gran cantidad de flores diariamente para satisfacer sus requerimientos tanto individuales como de la colonia (Nates-Parra, 2005).

Gran parte de la conservación de la biodiversidad de los ecosistemas está condicionada por la presencia de polinizadores eficientes y cuando se presentan procesos de degradación en los ecosistemas, que modifican la disponibilidad de recursos importantes para organismos como las abejas, tales como, alimento y sustratos para anidar, se provoca una disminución importante de las poblaciones de estas (Brosi *et al.*, 2007). Es por lo que, la riqueza de especies de meliponinos y su densidad poblacional son indicadores de lo perturbado o conservado de un ecosistema.

Por lo tanto, en términos generales, las abejas son un grupo funcional relevante por su papel en los ecosistemas (Neff y Simpson, 1993) y en la producción de cultivos como polinizadores (Pinkus *et al.*, 2005). Las de mayor importancia son las especies nativas, como las abejas sin aguijón (ASA) (Reyes-González *et al.*, 2017).

Las ASA están restringidas a las regiones tropicales del mundo y emplean una amplia gama de plantas para su alimentación, por lo que se consideran un factor clave para la producción de semillas y frutos al ser importantes polinizadores de varias plantas silvestres y cultivadas (Vit *et al.*, 2013).

Las ASA han establecido estrechos lazos coevolutivos de interdependencia con la flora nativa y son considerados unos de los principales polinizadores del neotrópico (Roubik, 1989), puesto que la polinización es llevada a cabo más eficientemente por la gran diversidad de polinizadores nativos presentes en las áreas de vegetación natural (Güemez-Ricalde *et al.*, 2003). Por tal motivo, la deforestación influye considerablemente en la estructura de la comunidad y en la dinámica de las poblaciones, como consecuencia de la disminución en la disponibilidad de sitios de anidación y de recursos alimenticios. Debido a esta condición, en las últimas décadas, ha surgido un gran interés por ampliar el conocimiento acerca de estas abejas, en respuesta a las alertas sobre la disminución de polinizadores (Freitas *et al.*, 2009). Esto es una de las consecuencias de que el declive de la polinización no perjudica solo las comunidades vegetales, sino que, como es de esperarse también influye negativamente en la purificación del aire, agua, así como los ciclos de los nutrientes y control de enfermedades (Potts *et al.*, 2010).

1.3 La meliponicultura en el sureste mexicano

Otro papel importante que tienen las ASA es como parte de la cultura ancestral en diferentes regiones. En el sureste mexicano la cría y manejo de las ASA es una actividad ancestral vinculada con la cultura Maya desde tiempos prehispánicos

(Freitas, 2018). Antes del contacto con Europa, la miel no sólo se utilizaba para endulzar platillos y bebidas o para elaboración de dulces; tenía también fines medicinales y jugaba un papel importante en los rituales. Para obtenerla, se cultivaban algunas variedades de abejas de los géneros *Trigona* y *Melipona*, particularmente la *Melipona beecheii* (Villanueva-Gutiérrez y Colli-Ucan, 1996). En la actualidad su práctica tiene como fin la obtención de productos como la miel, polen, cerumen y propoleo de numerosas especies de ASA para diversos propósitos, incluyendo alimentación, medicina y uso cultural y comercial (Quezada-Euán, 2005, Yurrita *et al.*, 2017, González *et al.*, 2018). Esto, es evidencia clara de la importancia significativa que tiene esta actividad, la cual ha dado lugar al desarrollo de todo un sistema cultural relacionado con el aprovechamiento sistemático de las ASA (Sánchez, 2019).

A través del implemento de técnicas de manejo, se ha logrado que, las colonias de ASA del inventario original, incremente a cifras superiores del número de colonias que poblaban de forma natural las selvas, con el fin de fomentar su aprovechamiento y explotación racional (González-Acereto, 2012).

Actualmente la especie con mayor aprovechamiento en la meliponicultura en la península de Yucatán es *M. beecheii*. Su producción ha sido organizada a nivel artesanal (Quezada-Euán *et al.*, 2018) y la importancia cultural de su miel y otros productos sigue vigente en la cocina tradicional, en las ceremonias y también en las prácticas terapéuticas (Eguiguren-López y Carmona-Segovia, 2012).

1.4 Principales amenazas de las abejas sin aguijón

Las poblaciones de polinizadores domesticados y silvestres, tales como abejas, pueden verse considerablemente afectadas por cambios en el ambiente; principalmente el cambio climático y pérdida de hábitat (Aleixo *et al.*, 2017).

Actualmente, ante la notable pérdida de especies de polinizadores, se ha generado una gran preocupación por la estabilidad de los servicios de polinización futuras (Decourtye *et al.*, 2019). Lo que conlleva a la búsqueda de alternativas que frenen estos acontecimientos, tales como la regulación de las técnicas agrícolas devastadoras y el uso desmedido de productos químicos dañinos para las especies vegetales y faunísticas (Bartomeus y Dicks, 2019, Tucks *et al.*, 2014). Los reportes de colonias de abejas perjudicadas por estas condiciones cada día aumentan por lo que estudios sobre su comportamiento y los factores puntuales que provocan disminución de sus colonias son relevantes.

En Europa y Estados Unidos es uno de los factores que ha provocado el descenso en las poblaciones de abejas son las plagas y parásitos de diversa naturaleza, los cuales producen enfermedades, provocando vulnerabilidad a las colonias y por consiguiente su desaparición (Potts *et al.*, 2010).

En la península de Yucatán, que comprende los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, se ha presenciado el decrecimiento de abejas sin aguijón por múltiples causas, principalmente, la deforestación para cultivos como la caña de azúcar y la introducción de *Apis mellifera* (Quezada-Euán *et al.*, 2015). La urbanización que cada día aumenta provoca que las ASA migren en busca de

nuevos nichos para su establecimiento, o bien, se adapten a las condiciones que ofrecen las poblaciones urbanas. Sin embargo, no todas las especies de ASA presentan la capacidad de adaptarse a la pérdida de su hábitat por causa de la urbanización tal es el caso de *Melipona beecheii*, la cual se localiza en áreas naturales conservadas (Freitas, 2018, Quezada-Euán, 2018).

Los nidos de las ASA se caracterizan por construirse en cavidades y en su mayoría son cavidades ya establecidas. Estas cavidades pueden encontrarse en árboles (preferentemente), suelo y muros de construcciones, incluso cementerios (Nates-Parra, 2006). A pesar de que los sitios estén ya creados, al crear un nuevo nido, las ASA delimitan las proporciones del nido con materiales como cerumen (Michener, 2007) y este trabajo está delegado a las obreras, las cuales mantienen estrecha comunicación con la colonia anterior que pueden ser semanas o meses, hasta que la nueva colonia se encuentra establecida con la llegada de la reina joven (Michener, 2007).

La deforestación y la fragmentación tienen como consecuencia un efecto negativo en la riqueza, abundancia y dispersión de especies. Dado que limita los recursos usados para el establecimiento de nidos (Roulston y Goodell, 2011) Muchas de las especies de ASA construyen sus nidos de manera preferente en troncos huecos de árboles vivos, por lo que la deforestación influye enormemente en la estructura de la comunidad y en la dinámica de las poblaciones, a causa de la disminución en la disponibilidad de sitios de anidación y de los recursos alimenticios (Siqueira *et al.*, 2012).

1.5 Aspectos biológicos de las abejas nativas sin aguijón

El comportamiento altamente eusocial es característico de las abejas sin aguijón (ASA). Al realizar reconstrucciones del estado ancestral bayesiano se menciona que, las abejas melíferas y las abejas sin aguijón heredaron las divisiones de trabajo en castas de sus ancestros, así como el comportamiento eusocial (Cardinal y Danforth, 2011). La diferenciación entre obreras y reinas se determina en las etapas de larva y pupa, como consecuencia de la cantidad de alimento proporcionado (Velthuis *et al.*, 1990). Asimismo, la secreción de sustancias ayuda para la diferenciación entre dichas castas (Hrncir *et al.*, 2016). Son el único grupo de abejas nativo de América que posee este comportamiento, y sus colonias perennes se reproducen por enjambres (Nates Parra, 2005; Schwarz y Bacon, 1948). Viven en colonias constituidas por muchas obreras (según la especie) y realizan las tareas de construcción y manutención de la estructura física de la colonia, colecta y procesamiento del alimento, cuidado de la cría y defensa del nido (Rovira *et al.*, 2005).

El tamaño de las colonias de abejas sin aguijón (ASA) en diferentes especies varía de pequeño con solo unas pocas docenas de individuos a grande con más de 100,000 (Michener, 2000). Al igual que las colonias de otros insectos eusociales, las ASA dependen de actividades cooperativas. En gran medida, estos están relacionados con la adquisición y almacenamiento de alimentos. Los nidos pueden establecerse en troncos de árboles, ramas, cavidades en el suelo, o estructuras de nidos abandonados por especies de mayor tamaño. También pueden establecerse en simbiosis con otros insectos como hormigas y termitas, así como ubicarse en

paredes de edificios cuando se encuentran cercanos a zonas urbanas (Nates-Parra, 2001). Las correspondientes interacciones coordinadas de los individuos de una colonia dependen de la comunicación entre ellos. De hecho, se sabe desde hace medio siglo (Lindauer 1956; Lindauer y Kerr 1958) que los recolectores de ASA no solo llegan a una fuente de alimento artificial, sino que también reclutan compañeros de nido para hacerlo (Villanueva-Gutiérrez *et al.*, 2005). Dentro del nido, hay diferentes formas y arreglos de las celdas de cría y recipientes de almacenamiento de alimentos. El tamaño y la forma de estas macetas varían entre las especies de abejas. El néctar almacenado o la miel madura se encuentran en los extremos de la cavidad del nido (para el almacenamiento durante períodos de florecimiento abundante), mientras que el polen y la miel rodean el área de la cría (Roubik, 2006). El cerumen es un producto usado dentro de la colmena para la formación de potes de almacenamiento, compuesto por la mezcla de la cera secretada por las abejas y resinas vegetales que obtienen del exterior. La miel y el polen se almacenan en potes de cerumen separadas. Otro producto usado por las abejas sin aguijón (ASA) es el propóleo que es un tipo de pegamento que sirve para la construcción de sus nidos y protección ante patógenos (Efin *et al.*, 2019).

Como parte de la protección del nido, los meliponinos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa. El más conocido es el hábito de pegarse al pelo o la piel de los invasores, mordiendo con las mandíbulas, aplicando resinas e intentando entrar en la nariz, ojos y orejas. Algunas especies sólo pegan la resina en el intruso y de vez en cuando muerden con sus mandíbulas (Michener, 2000). En especies como *Oxytrigona* al morder se liberan sustancias cáusticas (ácidos)

contra sus enemigos causando una irritación severa. Aunado a esto, cierto número de abejas de la colonia se posicionan a la entrada del nido como centinelas y de esta manera prevenir la entrada de intrusos al interior del nido (Grüter *et al.*, 2017). Estos hábitos les permite defender sus nidos de una manera eficaz.

1.6 Biología de anidación

En contraste con las abejas melíferas, el desarrollo de las ASA se limita a hábitats muy específicos, conformados por rangos geográficos muy estrechos. Sus nidos pueden estar ubicados en el interior de los huecos de los árboles vivos, termiteros (tacurú), hormigueros abandonados; así como en los más variados lugares donde encuentren espacios y seguridad para el desarrollo de las mismas (Arnold *et al.*, 2018): Postes, paredes, muros, canteras abandonadas, pequeñas cajas, etc. como ocurre con *Frieseomelitta*, *Friesella schrottkyi* y *Geotrigona*.

Asimismo, la arquitectura de anidación varía con relación a la especie y está altamente relacionada con las dimensiones morfológicas de la misma (Cuadro 1). Por ejemplo, las especies como *Schwarziana quadripunctata* y *Melipona quinquefasciata* construyen nidos subterráneos. De igual manera, en el sureste mexicano se ha observado a *Trigona fulviventris* presentar este tipo de comportamiento (visualización propia).

Por otro lado, la especie *Melipona bicolor* construye su nido en lugares frescos y húmedos como troncos de árboles próximos al suelo. Algunas especies del género *Partamona* construyen sus nidos semi-expuestos en cavidades con abertura

bastante amplia o en zonas de epifitas, samambaias o ambientes semejantes (Rovira, *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Hábitos de anidación de algunas especies de abejas sin aguijón, modificado de Roubik, 2006.

Hábito de anidación	Especie de abeja sin aguijón
Nido expuesto	<i>Dactylurina, Partamona, Plebeia, Trigona, Tetragonisca</i>
Asociación con termitas, hormigas o colonias de avispas	<i>Aparatrigona, Paratrigona, Partamona, Plebeia, Scaura, S. chwarzula, Sundatrigona, Trigona</i>
Nido subterráneo o no arbóreo, cavidad natural	<i>Geotrigona, Lestrimelitta, Melipona, Meliponula, Mourella, Nogueirapis, Paratrigona, Pariotrigona, Partamona, Plebeia, Plebeina, Ptilotrigona, Scaptotrigona, Schwarziana, Tetragonisca, Trigona</i>
Tubo de entrada flexible y/o cierre nocturno	<i>Friesella, Meliponula, Nannotrigona, Pariotrigona, Plebeia, Scaptotrigona, Scaura, Schwarziana, Trigona</i>
Entradas múltiples	<i>Lepidotrigona, Plebeia, Scaptotrigona, Tetragona</i>
Tubos ciegos por entrada	<i>Lestrimelitta, Partamona</i>
Tubo de drenaje o vertido de líquidos	<i>Geotrigona, Meliponula, Mourella, Schwarzula, Tetragona, Trigona.</i>
Celda de prisión	<i>Friesella, Frieseomelitta, Plebeia, Schwarziana, Tetragonisca</i>
Entrada de nido críptico	<i>Austroplebeia, Celetrigona, Dolichotrigona, Friesella, Geotrigona, Hypotrigone, Leurotrigone, Liotrigone, Lisotrigone, Melipone, Meliponula, Mourella, Paratrigone, Plebeia, Schwarziana, Schwarzula, Trigonisca</i>
Nido falso	<i>Partamona, Plebeia</i>

Cuadro 2. Comportamiento defensivo de algunas especies de abejas sin aguijón, modificado de Roubik, 2006.

Comportamiento	Especies de meliponino
Agresividad de obreros	<i>Duckeola, Heterotrigona, Hypotrigona, Lophotrigona, Melipona, Oxytrigona, Paratrigona, Partamona, Plebeia, Ptilotrigone, Scaptotrigona, Tetragona, Tetragonisca, Tetragonula, Trigona</i>
Defensa química irritante	<i>Oxytrigona, Melipona</i>
Resina adhesiva aplicada en el exterior de la entrada del nido, en el sustrato o tubo	<i>Lepidotrigona, Scaura, Tetragona, Tetragonula, Trigonisca</i>
Defensores del nido en la entrada	<i>Lestrimelitta, Tetragona, Tetragonisca, Scaptotrigona, Frieseomelitta</i>

1.7 Distribución de las abejas sin aguijón

Los meliponini, son un grupo altamente diverso característico de los trópicos, adaptados para sobrevivir en un extenso territorio, como bosques profundos, así como bosques que se encuentren cerca de aldeas. A pesar de la rápida devastación de estos ambientes naturales, aún se puede encontrar numerosos lugares donde estas abejas construyen sus nidos de forma natural (Morato y Martins, 2006).

Los meliponinos viven en colonias perennes, que tienen una distribución pantropical (Figura 2), pero el mayor número de especies se encuentra concentrado en el extenso territorio sudamericano, donde está presente la mayor diversidad con más de 600 especies (Lavinás *et al.*, 2018), sin embargo, los meliponinos son abundantes, diversos y por las condiciones particulares de los trópicos, son más activos en ellos (Macías-Macías *et al.*, 2011).



Figura 2. Distribución pantropical de abejas sin aguijón (Hrncir *et al.*, 2016).

En América tropical todos los grupos taxonómicos están representados por lo que se le considera como centro de diversificación (Reyes-González *et al.*, 2017; Sommeijer, 1999). En México, están presentes 11 géneros y 46 especies de la Tribu Meliponini (Ayala, 1999). En la Península de Yucatán se han reportado un total de 17 especies y en el estado de Campeche un total de 11 especies (marcados con una X en el cuadro 4) (Ayala *et al.*, 2013).

Cuadro 3. Especies de abejas sin aguijón reportados en México y en el estado de Campeche (modificado de Ayala *et al.*, 2013).

Género	Total	México	Campeche
<i>Cephalotrigona</i>	5	3 (2)	X
<i>Frieseomelitta</i>	16	1	X
<i>Geotrigona</i>	21	1	
<i>Lestrimelitta</i>	21	2 (1)	
<i>Melipona</i>	70	6(3)	X
<i>Nannotrigona</i>	10	1	X
<i>Noguerapis</i>	4	1	
<i>Oxytrigona</i>	11	1	
<i>Paratrigona</i>	34	2	
<i>Partamona</i>	39	2	X
<i>Plebeia</i>	42	11 (4)	
<i>Proplebeia</i>	4	1	
<i>Scaptotrigona</i>	22	3(1)	X
<i>Scaura</i>	7	1	
<i>Tetragona</i>	19	1	
<i>Tetragonisca</i>	4	1	
<i>Trigona</i>	32	5	X
<i>Trigonisca</i>	43	(2)	

Los números en paréntesis indican las especies endémicas

1.8 Especies reportadas en el estado de Campeche

Campeche es uno de los estados que conforman la Península de Yucatán, el cual en materia de investigación y estudios científicos se encuentra a niveles inferiores con relación a los otros dos estados de la península. Con respecto a meliponinos, se han reportado actualmente un total de 11 especies (Ayala *et al.*,

2013). Entre los que se encuentran los géneros *Melipona*, y *Trigona* como los principales cultivados a través de la meliponicultura, aunque otros géneros como *Scaptotrigona* pueden tener potencial para su cultivo y producción (Hurtado-Burillo *et al.*, 2013).

Actualmente, debido al cultivo intensivo de colonias para meliponicultura, en el que se practica también la sustracción de colonias silvestres, se ha provocado que algunas especies difícilmente se puedan encontrar de manera silvestre. Las especies del género *Melipona* son muy sensibles a modificaciones del ambiente, de manera que no es frecuente encontrar sus nidos en ambientes altamente fragmentados y modificados (Quezada-Euán *et al.*, 2018, Silveira *et al.*, 2002).

1.9 Taxonomía de abejas nativas sin aguijón

El orden de los Hymenópteros posee una amplia diversidad. El cual incluye avispas, hormigas y abejas (Michener, 2007). Dentro de este orden, se encuentran dos subordenes, Symphyta y Apocrita (Aguiar *et al.*, 2013). Los ápidos (Apidae) son una familia de himenópteros apócritos, constituidos por un numeroso grupo de abejas.

Las abejas (clase: Insecta, orden: Hymenoptera, familia: Apidae) constituyen uno de los grupos de insectos de mayor abundancia en el mundo, las cuales están distribuidas en 7 familias (NCBI, 2017). Incluyen, las familias Stenotritidae, Colletidae, Andrenide, Halictidae, Melittidae, Megachilidae y Apidae (Michener, 2007).

La familia Apidae está constituida por la abeja melífera o doméstica (la más conocida), las abejas sin aguijón, las abejas de las orquídeas, las abejas parásitas, los abejorros carpinteros, además de otros grupos menos conocidos (Riera, 2012).

La subfamilia Apinae incluye cuatro tribus de abejas corbiculadas, los Euglossini, los Bombini, los Apinini y los Meliponini (Michener, 2007). Las abejas nativas sin aguijón pertenecen a la tribu Meliponini, de la cuales destacan por ser prometedoras en la meliponicultura, dos géneros principales: *Melipona* y *Trigona* (Quezada-Euán, 2005b). *Melipona beecheii* que es la abeja representante de la cultura maya, se distribuye desde México hasta Costa Rica (Villanueva-G *et al.*, 2005). En México, está representada a lo largo de la costa del Pacífico, los estados de Guerrero y Michoacán (Yurrita *et al.*, 2017).

Familia: Apidae

Subfamilia: Meliponinae

Género: *Aparatrigona*, *Apotrigona*, *Austroplebeia*, *Axestotrigona*, *Celetrigona*, *Cephalotrigona*, *Dactylurina*, *Dolichotrigona*, *Duckeola*, *Friesella*, *Frieseomelitta*, *Geotrigona*, *Heterotrigona*, *Homotrigona*, *Hypotrigona*, *Lepidotrigona*, *Lestrimelitta*, *Leurotrigona*, *Liotrigona*, *Lisotrigona*, *Lophotrigona*, *Meliplebeia*, *Melipona*, *Meliponula*, *Meliwillea*, *Mourella*, *Nannotrigona*, *Nogueirapis*, *Odontotrigona*, *Oxytrigona*, *Parapartamona*, *Paratrigona*, *Partamona*, *Platytrigona*, *Plebeia*, *Plebeiella*, *Plebeina*, *Ptilotrigona*, *Scaptotrigona*, *Scaura*, *Schwarziana*, *Schwarzula*, *Sundatrigona*, *Tretragona*, *Tetragonilla*, *Tetragonisca*, *Tetragonula*, *Tetrigona*, *Trichotrigona*, *Trigona*, *Trigonisca*.

Figura 3. Meliponinos reconocidos actualmente según base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (2019).

1.10 Distribución espacial de los nidos de ASA

El principal problema que enfrenta América Latina para conservar la fauna de abejas nativas es la falta de información sobre riqueza, diversidad, taxonomía, distribución, dinámica poblacional e impacto de las actividades del hombre en la mayoría de las especies de abejas, asociadas a creencias locales, que no siempre se corresponden con la verdad. La fauna de abejas neotrópicas es rica y diversa, pero poco estudiada (Freitas *et al.*, 2009).

La densidad de nidos de abejas sin aguijón (ASA) es muy variable entre diferentes formaciones vegetales y hábitats en un mismo ecosistema (Barquero-Elizondo *et al.*, 2019). Los principales factores causantes de la disminución de la riqueza y abundancia de especies de abejas nativas son el cambio climático, en combinación con el cambio de uso de suelo (Frankie *et al.*, 1997). Estos factores afectan la distribución de los nidos de ASA en los diferentes ecosistemas puesto que las especies se ven obligadas a localizar sitios de anidación que ofrezcan las condiciones de seguridad necesarias para establecer la colonia. Lo que provoca que ciertas especies solo se localicen en ambientes específicos. Es probable que otro de los factores para el establecimiento de nuevas colonias en las ASA sea la disponibilidad de cavidades sin importar el tipo de sustrato. Algunos meliponinos exploran y prefieren lugares con sitios de anidamiento disponibles, específicamente huecos, independientemente de si se encuentran en condiciones naturales o en construcciones urbanas, incluso en cementerios (Nates-Parra, 2006, Freitas, 2018). Sin embargo, algunas especies endémicas, como *Melipona colimana* se ven afectadas por los diversos acontecimientos que provocan la disminución de los sitios

para establecimiento de nidos, como la deforestación forestal excesiva. Lo cual obliga a las poblaciones de ASA a distribuirse en forma de agregados como lo reporta Macias-Macias *et al.*, (2014) a consecuencia de las variaciones ambientales relativamente pequeñas pero muy importantes para las ASA. Asimismo, en otros estudios se han reportado otras formas de distribución. En la especie *Tetragonisca angustula* se observó distribución por conglomerados en sitios con pastizales y sitios agroforestales. En el sitio urbano esta misma especie mostró una distribución aleatoria con tendencia a dispersarse. En el caso de *Trigona fulviventris* este estudio reporta una distribución sobredispersada y solitaria (Fierro *et al.*, 2012).

ESTUDIO DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A INSECTOS

2.1 Microorganismos simbióticos en insectos

Todos los organismos están incluidos con una comunidad diversa de microbios comúnmente conocido como microbioma, el cual es un factor crucial para la salud del huésped (Engel *et al.*, 2016). En promedio, las comunidades bacterianas asociadas a insectos no son demasiado diversas (Jones *et al.*, 2013), no obstante, la microbiota interna de los insectos es una fuente aún no explorada a profundidad como fuente de recursos microbianos. Los insectos biosintetizan ácidos grasos, pero carecen de genes necesarios para la producción de enzimas para la biosíntesis de compuestos como esteroides, necesarios para su nutrición. Debido a esto, los insectos se han visto en la necesidad de establecer relaciones estrechas con microorganismos que llevan a cabo esta función (Paludo *et al.*, 2018).

Las relaciones establecidas con una gran diversidad microbiana permiten a los hospederos explotar nuevas dietas al desarrollar un conjunto de capacidades metabólicas, por lo que en muchos casos se presenta una coevolución entre los insectos y su microbioma (Martinson *et al.*, 2011). Como en muchos otros insectos, las bacterias, los mohos y las levaduras también parecen jugar un papel importante tanto para la nutrición de las abejas como para la protección en contra de microorganismos dañinos (Anderson *et al.*, 2013; Gilliam *et al.*, 1990).

Con respecto a la relación que tiene el microbioma y la fuente de alimento, la mayor parte de los estudios con este enfoque se han hecho sobre abejas melíferas (*Apis mellifera*) y han encontrado que la variación de la microbiota intestinal está

determinada por la variedad de origen alimenticio (Yoshiyama y Kimura, 2009). A su vez, se ha visto que el origen geográfico no influye en el microbioma de forma determinada como lo hace el tipo de abeja, el tamaño y número de integrantes en la colonia (Kwong *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha visto que los microorganismos aislados de las abejas pueden servir de defensa contra patógenos, por ejemplo, Piccini *et al.* (2004) aislaron de los panales de cría y de las colmenas de *Apis mellifera*, bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leifsonia*, *Paenibacillus* y *Proteus*. De igual manera, encontraron hongos pertenecientes a los géneros *Rhizopus* en las muestras de polen joven y *Alternaria* en las de polen de corbículas, y *Epicoccum* en las de polen maduro. Este último hongo se ha encontrado frecuentemente asociado a la necromasa de numerosas plantas, y se sabe que es capaz de producir compuestos como antibióticos que evitan la proliferación de patógenos en las abejas.

Asimismo, se ha reportado la presencia de otros microorganismos sin saber su asociación con las abejas, por ejemplo, en la abeja de la alfalfa (*Megachuile rotundata*) se observó un predominio de hongos como *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Saccharomyces* sp. y también bacterias, principalmente, *Bacillus circulans*, *B. mycoides*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp. (Inglis *et al.*, 1993; Leonhardt y Kaltenpoth, 2014).

Los meliponini, no son la excepción al referirse al establecimiento de relaciones simbióticas con una gran diversidad de microorganismos. No obstante, la mayoría

de las investigaciones existentes con respecto a microorganismos aislados en abejas, están enfocadas principalmente en abejas melíferas y abejorros (Leonhardt y Kaltenpoth, 2014), siendo muy pocos los estudios sobre microorganismos asociados a abejas nativas sin aguijón, dejando el conocimiento sobre su biodiversidad muy limitado, debido a que la mayoría de artículos solo reportan su presencia y no su función.

2.2 Microorganismos asociados a meliponinos o abejas sin aguijón

2.2.1 Importancia de los microorganismos en las abejas sin aguijón

En las abejas, los microorganismos parecen jugar un papel muy importante en la transformación del polen a pan de abeja, a partir de un proceso de fermentación en el cual se involucran principalmente bacterias, hongos y levaduras (Portillo-Carrascal, 2016). Después de que las abejas realizan la recolección de polen y néctar de las flores para la colonia, el proceso de almacenamiento hace que se vuelvan bioquímicamente distintos, debido a los procesos de fermentación. De acuerdo con sus propiedades bioquímicas, algunas de las bacterias pueden estar involucradas en la degradación de los compuestos de la capa externa del polen pero no está claro si las levaduras o bacterias (o ambas) son responsables de estos procesos (Ganter, 2006). Es conocido que la mayoría de los microorganismos intestinales o sus productos tienen un papel beneficioso para sus hospedantes (Krishnan *et al.*, 2014). Las principales bacterias que se han reportado como simbioses de abejas, sean, abejas melíferas, abejorros o abejas sin aguijón, son las bacterias ácido-lácticas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* capaces de descomponer enzimáticamente y fermentar los azúcares encontrados en el polen,

la miel y el néctar (Kwong *et al.*, 2014, Zheng *et al.*, 2016). Otras bacterias intestinales se han especializado en ubicaciones físicas particulares, como *Snodgrassella*, que ocupa la pared intestinal (Martinson *et al.*, 2012) y *Parasaccharibacter*, que se encuentra en alimentos larvarios y glándulas hipofaríngeas en abejas obreras (Corby-Harris *et al.*, 2014). Asimismo, otros microorganismos, por ejemplo, el hongo *Zygosacharomyces* es esencial en el desarrollo óptimo de las larvas y pupas de *Scaptotrigona depilis*, debido a que produce un esteroide, necesario para su desarrollo (Paludo *et al.*, 2018).

En comparación con *Apis* y *Bombus*, el microbioma de las ASA parece abarcar un rango mucho mayor de especies posibles, siendo muy variable en composición, riqueza y uniformidad. En la ASA *Tetragonula carbonaria*, por ejemplo, se ha reportado *Snodgrassella* y *Parasaccharibacter*, pero la presencia de estos microorganismos en las colonias de esta especie está determinada por el sitio en que se establezca (Kwong *et al.*, 2017).

Por otra parte, la miel es el producto de la colmena con más estudios ya que posee diversas propiedades entre las que destacan la actividad antimicrobiana. Se cree que esta actividad se debe en gran parte a los microorganismos que las abejas transfieren al néctar y que participan en el proceso de fermentación. Buchener, 1967, comprobó esta teoría al suministrar a abejas en cautiverio agua y azúcar como alimentación artificial, posteriormente, evaluó la miel proveniente de este periodo de alimentación y él observó que la actividad antimicrobiana de la miel persistía, por lo que concluyó que la actividad no está dada por el polen y néctar que toma de las flores.

Asimismo, en el polen de la cual se alimentan las crías de abejas se han identificado compuestos que podrían ser indigeribles para ellas, por lo que las adultas realizan un tratamiento al polen, que permite eliminar estos compuestos mediante la secreción de enzimas para la fermentación y la conversión de los constituyentes del polen (Gilliam *et al.*, 1990), en las que es muy probable que intervengan variedad de microorganismos (García *et al.*, 2006). Otra función de los microorganismos asociados es la protección ante otros microorganismos que pueden resultar dañinos para las abejas (Menezes *et al.*, 2015).

2.2.2 Microorganismos aislados de abejas sin aguijón

Muchas particularidades de las abejas sin aguijón (ASA) son aún desconocidas, debido a que los principales estudios versan hacia *Apis mellifera*. A pesar de ello, los principales estudios que se han realizado son en su mayoría, relacionados con las propiedades antimicrobianas de sus productos, tales como la miel, polen, propóleo y geopropóleo (da Cunha *et al.*, 2013; Portillo-Carrascal, 2016; Segura-Campos, 2015; Zamora y Arias, 2011). Por ejemplo, se han observado propiedades antimicrobianas de la miel hacia cepas resistentes a fármacos, como resultado del efecto sinérgico de la mezcla de miel de 2 especies de ASA, *Scaptotrigona bipunctata* y *Scaptotrigona postica* (Nishio *et al.*, 2016). De igual manera, la miel de la ASA, *Trigona* sp. inhibió el crecimiento de *Paenibacillus larvae* y *Melisococcus plutonius* que son los responsables de la enfermedad loque americana y loque europea respectivamente, las cuales son patologías con más efecto negativo en las colonias de abejas melíferas, principalmente *A. mellifera*. Por esta característica se cree que las especie de ASA no presentan estas patologías (Kroiss *et al.*, 2010).

Existe muy poco conocimiento sobre las funciones de los microorganismos de la manera en que se aborda en el estudio realizado por Camargo et al. (1992). Estos autores mencionan que la composición característica del polen almacenado por la especie de ASA *Ptilotrigona lurida*, se atribuye al hongo *Candida* sp., y que la razón de su presencia en el polen es porque tiene la función de mantenerlo deshidratado durante su conservación por largos períodos de tiempo y de esta forma evitar la atracción de especies cleptoparásitas a la colmena.

Otro estudio realizado con el objetivo de determinar la función de los microorganismos asociados a las ASA es el de Menezes et al. (2015). Descubrieron una fuerte relación simbiótica entre el hongo *Monascus* sp. y la especie *Scaptotrigona depilis*. La función del hongo es proporcionar a las larvas de *S. depilis*, a través de la alimentación, los nutrientes necesarios para desarrollarse y completar adecuadamente su metamorfosis desde su estado de huevo hasta la pupación. Esto fue determinado a partir de la observación de la disminución de hasta un 80% de individuos en ausencia de este microorganismo (Menezes et al., 2015).

Posterior al trabajo anteriormente mencionado, en otro estudio determinaron mediante pruebas *in vitro* con diferentes estadios larvales de *Scaptotrigona depilis*, que el hongo *Zygosacharomyces* es capaz de producir esteroides, los cuales son necesarios para el desarrollo larval de estas abejas sin aguijón (Paludo et al, 2018). Estos esteroides son adquiridos a través de el alimento larval y debido a que, como la mayoría de los insectos, las abejas carecen de enzimas para la biosíntesis de ácidos grasos y en específico esteroides, la síntesis de ellos, se lleva a cabo gracias a su simbiosis con este tipo de microorganismos. También, recientemente, se ha

encontrado que *Candida* sp. produce etanol y alcohol isoamílico y es capaz de promover el crecimiento de *Zygosaccharomyces* que es necesario para el desarrollo larval de *Scaptotrigona depilis* (Paludo *et al.*, 2019).

Por otro lado, existen otros estudios, en los que solo se mencionan los microorganismos aislados a partir de meliponinos, sin embargo, como anteriormente se mencionó no se han establecido su función concreta (Cuadro 4). Se ha observado una fuerte asociación entre la levadura *Starmerella meliponinorum* y los meliponinos *Tetragonisca angustula* y *Frieseomelitta varia* (Rosa *et al.*, 2003). Así como la asociación entre el hongo *Aspergillus* sp. y la abeja sin aguijón *Scaptotrigona depilis* (Ferraz *et al.*, 2008). Con estos antecedentes es de gran importancia estudiar la funcionalidad de los microorganismos.

Cuadro 4. Microorganismos reportados en diferentes tejidos y productos de abejas sin aguijón

Abeja	Tejido/Producto	Microorganismo aislado	Autor/ Año
<i>Melipona fasciata</i>	Miel, polen, provisión de cría	<i>Bacillus alvei</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. circulans</i>	(Gilliam <i>et al.</i> , 1990)
<i>Proplebeia dominicana</i>	Abdomen	<i>Bacillus</i> spp., <i>B. pumilus</i> , <i>B. firmus</i> <i>B. subtilis</i> , <i>B. circulans</i>	Cano, 1994 (Gilliam, <i>et al.</i> , 1990)
<i>Trigona carbonaria</i>	Miel, polen	<i>Candida</i> spp., <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Boorn K.L. <i>et al.</i> , 2010)
<i>Tetragonula carbonaria</i> , <i>Astroplebeia australis</i> , <i>Tetragonula hockingsii</i>	Cuerpo	<i>Lactobacilos</i> spp.	Rosano-Hernández, 2011 Leonhardt y Kaltenpoth, 2014, Boorn <i>et al.</i> , 2010

DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO, LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS PETENES

3.1 Generalidades de la RBLP

La Reserva de la Biósfera de los Petenes (LRBP) fue decretada como reserva de la biósfera a partir del año 1999. Antes de ello era considerada como un área natural. Esta se encuentra ubicada en la franja costera del noroeste del estado de Campeche 20° 51' 29.88" N, 90° 19' 59.88" W; altitud alrededor de 0.4 m (Torrescano-Valle, 2010), en los municipios de Calkiní, Hecelchakán, Tenabo y Campeche. Para el estado es una de las reservas de gran importancia, debido a su particularidad vegetal. Esto le permite albergar muchas especies faunísticas pues brinda alimento, agua y protección a todo aquel que la ocupa de forma temporal o permanente (Zamora-Crescencio *et al.*, 2015).

La RBLP cuenta con un área total de 282 mil 857 hectáreas, de las cuales el 50% son áreas marinas (Villalobos-Zapata y Mendoza-Vega, 2010). Presenta una alta heterogeneidad ambiental, que permite la existencia de múltiples hábitats que sostienen una elevada biodiversidad global. Esta Incluye a numerosas especies de reptiles, anfibios, mamíferos e insectos. La vegetación de la RBLP está conformada por varias comunidades vegetales. Por ejemplo, diferentes especies de manglar, tular (*Typha dominguensis*), zacatal (*Cladium jamaicense*), selva baja inundable, blanquizales (*Ruppia marítima*), chechenales (*Metopium brownei*) y "petenes" (Zamora-Crescencio *et al.*, 2015). En esta Reserva se encuentran al menos 473 especies vegetales, de las cuales 22 son endémicas, tres son especies amenazadas, dos son especies raras y cinco pertenecen al grupo de especies bajo

protección especial, las cuales podrían albergar especies de meliponinos aún no descritos en el estado (Rosano-Hernández, 2011). Los recursos nectíferos de la reserva benefician la actividad apícola, y hacen factible la producción sostenible de miel, porque existen condiciones socioambientales propicias, representadas por el capital social, económico y natural (Pat-Fernández *et al.*, 2012).

Por otra parte, esta reserva también está conformada por ecosistemas característicos, que se describen a continuación:

3.1.1 Petén

Son islotes rodeados de vegetación arbórea que emergen de vegetación baja inundable, que en la mayoría de las ocasiones poseen un cenote en la parte central del mismo. También conformado por terrenos bajos pantanosos que se localizan muy cercanos a la costa, dentro de una matriz de suelo de alta salinidad denominada blanquizal; que son franjas palustres generalmente sin cubierta vegetal, conformadas por intrusiones salinas. Este ambiente extremo de salinidad es favorecido por la alta evaporación del agua durante las cálidas temperaturas de verano (>30 °C) (Villalobos-Zapata y Mendoza-Vega, 2010).

3.1.2 Marisma

Área que conforma gran parte de la reserva y se caracteriza por permanecer la mayor parte del año inundado con agua dulce y marina, proveniente de canales colindantes con la costa, pero principalmente por agua de lluvia (Villalobos-Zapata y Mendoza-Vega, 2010).

3.1.3 Manglar

El manglar es también parte de la vegetación característica de esta reserva, el cual consta de árboles que pueden llegar a crecer más de 8 metros. Las especies encontradas en esta reserva son *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans* (Villalobos-Zapata y Mendoza-Vega, 2010).

LITERATURA CITADA

Aguiar, A.P., Deans, A.R., Engel, M.S., Forshage, M., Huber, J.T., Jennings, J.T., Johnson, N.F., Lelej, A.S., Longino, J.T., Lohrmann, V., Mikó, I., Ohl, M., Rasmussen, C., Taeger, A., Yu, D.S.K., 2013. Order Hymenoptera. Zootaxa 3703, 51. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.12>

Aleixo, K.P., Menezes, C., Imperatriz Fonseca, V.L., da Silva, C.I., 2017. Seasonal Availability of Floral Resources and Ambient Temperature Shape Stingless Bee Foraging Behavior (*Scaptotrigona aff. depilis*). Apidologie 48, 117–127. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0456-4>

Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Mott, B.M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M.R., Walton, A., Jones, B.M., Corby-Harris, V., 2013. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honeybees (*Apis mellifera*). PLOS ONE 8, e83125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>

Arnold, N., Ayala, R., Mérida, J., Sagot, P., Aldasoro, M., & Vandame, R. (2018). Registros nuevos de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) para los estados de Chiapas y Oaxaca, México. Revista mexicana de biodiversidad, 89(3), 651-665.

Ashworth, L., Quesada, M., Casas, A., Aguilar, R., Oyama, K., 2009. Pollinator-dependent food production in Mexico. Biological Conservation 142, 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.01.016>

Ayala, 1999. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera: apidae: meliponini) 123.

Ayala, R., Gonzalez, V.H., Engel, M.S., 2013. Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), Pot-Honey. Springer New York, New York, NY, pp. 135–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9

Bartomeus, I., y Dicks, L. V. (2019). The need for coordinated transdisciplinary research infrastructures for pollinator conservation and crop pollination resilience. *Environmental Research Letters*, 14(4), 045017.

Brosi, B.J., Daily, G.C., Ehrlich, P.R., 2007. Bee community shifts with landscape context in a tropical countryside. *Ecological Applications* 17, 418–430. <https://doi.org/10.1890/06-0029>

Buchner, R., 1967. Über den Unterschied von Bienenhonig aus Blüten- und Honigtautracht 5.

Camargo J.M.F., D. Roubik (1991) Systematics and Bionomics of the Apoid Obligate Necrophages: The *Trigona hypogea* Group *Biological Journal of the Linnean Society* 44:13-39

Camargo, J. M., David, A. G., y Pedro, S. R. (2000). The extinct fauna of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in Dominican amber: Two New Species and Redescription of the Male of *Proplebeia dominicana* (Wille and Chandler). *American Museum Novitates*, 2000(3293), 1-24.

Cardinal, S., Danforth, B.N., 2011. The Antiquity and Evolutionary History of Social Behavior in Bees. *PLOS ONE* 6, e21086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086>

da Cunha, M.G., Franchin, M., Galvão, L., de Ruiz, A., de Carvalho, J.E., Ikegaki, M., de Alencar, S.M., Koo, H., Rosalen, P.L., 2013. Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Stingless Bee *Melipona scutellaris* Geopropolis. BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 23.

De Camargo, J. M. F., & de Menezes Pedro, S. R. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. *Apidologie*, 23(6), 509-522.

Decourtye, A., Alaux, C., Le Conte, Y., y Henry, M. (2019). Toward the protection of bees and pollination under global change: present and future perspectives in a challenging applied science. *Current opinion in insect science*.

Efin, A., Atmowidi, T., & Prawasti, T. S. (2019). Morphological Characteristics and Morphometric of Stingless Bee (Apidae: Hymenoptera) from Banten Province, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(6).

Eguiguren López, A.M., Carmona Segovia, J.X., 2012. Estudio del cacao y propuesta gastronómica de autor (B.S. thesis). Quito/UIDE/2012.

Elizondo, A. I. B., Monge, I. A., Cartín, A. L. M., Sánchez, G. H., Toruño, H. S., Flores, W. M., y Montano, I. M. (2019). Asociación entre abejas sin aguijón (Apidae, Meliponini) y la flora del bosque seco en la región norte de Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 70-91.

Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., y Emery, O. 2016. The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio*, 7(2), e02164-15.

Ferraz, R.E., Lima, P.M., Pereira, D.S., Freitas, C.C., Feijó, F., 2008. Fungi microbiot of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical entomology* 37, 345–346.

Fierro, M. M., Cruz-Lopez, L., Sanchez, D., Villanueva-Gutierrez, R., & Vandame, R. (2012). Effect of biotic factors on the spatial distribution of stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in fragmented neotropical habitats. *Neotropical Entomology*, 41(2), 95-104.

Frankie, G. W., Vinson, S. B., Rizzardi, M. A., Griswold, T. L., O'Keefe, S. y Snelling, R. R. (1997). Diversity and Abundance of Bees Visiting a Mass Flowering Tree Species in Disturbed Seasonal Dry Forest, Costa Rica. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 70(4), 281-296.

Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A. de M.P., Galetto, L., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J.J.G., 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie* 40, 332–346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>

Freitas, C. D. A. (2018). Especies de abejas sin aguijón en áreas urbanas de Yucatán. Parte I: nidos con entradas visibles. de la Universidad Autónoma de Yucatán. 112 pp

Ganter, P.F., 2006. Yeast and Invertebrate Associations, in: Péter, G., Rosa, C. (Eds.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 303–370. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_14

García, D.G., Mogollón, M.A.R., Nieves, J.S., 2006. Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana* 11, 123.

Gilliam, M., Roubik, D.W., Lorenz, B.J., 1990. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21, 89–97. <https://doi.org/10.1051/apido:19900201>

Gonzalez, V. H., Amith, J. D., y Stein, T. J. (2018). Nesting ecology and the cultural importance of stingless bees to speakers of Yoloxóchitl Mixtec, an endangered language in Guerrero, Mexico. *Apidologie*, 49(5), 625-636.

González-Acereto, J.A., 2012. La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrobiencias*, (1) 34–41.

Grüter, C., Segers, F.H.I.D., Menezes, C., Vollet-Neto, A., Falcón, T., von Zuben, L., Bitondi, M.M.G., Nascimento, F.S., Almeida, E.A.B., 2017. Repeated evolution of soldier sub-castes suggests parasitism drives social complexity in stingless bees. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-016-0012-y>

Güemez-Ricalde, F.J., Echazarreta-González, C., Villanueva-G, R., Pat-Fernández, J.M., Gómez-Álvarez, R., 2003. La apicultura en la península de Yucatán 17.

Gutiérrez, R. V., & Ucan, W. C. (1996). La apicultura en la Península de Yucatán, México y sus perspectivas. *Folia Entomológica Mexicana*, 97, 55-last page.

H. Zheng, A. Nishida, W. K. Kwong, H. Koch, P. Engel, M. I. Steele, N. A. Moran, Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio* 7, e01326-16 (2016).

Hrnčir, M., Jarau, S., Barth, F.G., 2016. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 202, 597–601. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1117-9>

Hurtado-Burillo, M., Ruiz, C., de Jesús May-Itzá, W., Quezada-Eúan, J.J.G., De la Rúa, P., 2013. Barcoding stingless bees: genetic diversity of the economically important genus *Scaptotrigona* in Mesoamerica. *Apidologie* 44, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0146-9>

Inglis, G.D., Sigler, L., Goette, M.S., 1993. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microb Ecol* 26, 125–143. <https://doi.org/10.1007/BF00177048>

Jones, R.T., Sanchez, L.G., Fierer, N., 2013. A Cross-Taxon Analysis of Insect-Associated Bacterial Diversity. *PLOS ONE* 8, e61218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061218>

Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci* 274, 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V.A., Rajendhran, J., Gunasekaran, P., 2014. Insect gut microbiome – An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, S16–S21. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C95>

Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Schneider, B., Schwinger, M.-G., Hertweck, C., Maddula, R.K., Strohm, E., Svatoš, A., 2010. Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nature Chemical Biology* 6, 261–263. <https://doi.org/10.1038/nchembio.331>

Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2014). Genome sequences of *Lactobacillus* sp. strains wkB8 and wkB10, members of the Firm-5 clade, from honey bee guts. *Genome Announc.*, 2(6), e01176-14.

Kwamong P, Aidoo K, Combey R, and Karikari, A. 2010. Stingless bees: Importance, Management and Utilization. A training manual for stingless beekeeping. Unimax Macmillan Ltd. Ghana: Accra North. 72 pp.

Lavinas, F. C., Macedo, E. H. B., Sá, G. B., Amaral, A. C. F., Silva, J. R., Azevedo, M., y Rodrigues, I. A. (2019). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(3), 389-399.

Leonhardt, S.D., Kaltenpoth, M., 2014. Microbial Communities of Three Sympatric Australian Stingless Bee Species. PLOS ONE 9, e105718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105718>

Lindauer, M. 1956 Über die Verständigung bei indischen Bienen. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 38, 521–557. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00341108>

Lindauer, M. & Kerr, W.E. 1958 Die gegenseitige Verständigung bei den stachellosen Bienen. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 41, 405–434. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00344263>

Macias-Macias, J. O., Quezada-Euan, J., Tapia-Gonzalez, J. M., & Contreras-Escareño, F. (2014). Nesting sites, nest density and spatial distribution of *Melipona colimana* Ayala (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in two highland zones of western, Mexico. Sociobiology, 61(4), 423-427.

Macías-Macías, J.O., Quezada-Euán, J.J.G., Contreras-Escareño, F., Tapia-Gonzalez, J.M., Moo-Valle, H., Ayala, R., 2011. Comparative temperature tolerance in stingless bee species from tropical highlands and lowlands of Mexico and implications for their conservation (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Apidologie 42, 679–689. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0074-0>

Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N.A., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Molecular Ecology 20, 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>

Menezes, C., Vollet-Neto, A., Marsaioli, A.J., Zampieri, D., Fontoura, I.C., Luchessi, A.D., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2015. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Curr. Biol.* 25, 2851–2855. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.028>

Michener, C.D., 2000. *The Bees of the World*. JHU Press.

Michener, C.D., 2007. *The bees of the world*, 2nd ed. ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Michener, C.D. 2013. The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S.R.M. & Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp. 3–17.

Morato, E.F., Martins, R.P., 2006. An overview of proximate factors affecting the nesting behavior of solitary wasps and bees (Hymenoptera: Aculeata) in preexisting cavities in wood. *Neotrop. Entomol.* 35, 285–298.

Nates-Parra, G., 2001. Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana* 17.

Nates Parra, G., 2005. Abejas silvestres y polinización.

Nates-Parra, G., Rodríguez, Á., & Vélez, E. D. 2006. Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) en cementerios de la cordillera oriental de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 25-35.

Ndungu, N. N., Nkoba, K., Sole, C. L., Pirk, C. W., Abdullahi, A. Y., Raina, S. K., & Masiga, D. K. 2018. Resolving taxonomic ambiguity and cryptic speciation of *Hypotrigena* species through morphometrics and DNA barcoding. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 354-363.

Neff, J. L., y Simpson, B. B. 1993. Hymenoptera and Biodiversity, eds LaSalle J. Gauld ID (CAB International, Wallingford, UK), 143-167.

Nishio, E.K., Ribeiro, J.M., Oliveira, A.G., Andrade, C.G.T.J., Proni, E.A., Kobayashi, R.K.T., Nakazato, G., 2016. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports* 6, 21641. <https://doi.org/10.1038/srep21641>

Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Iyabo, O.O., 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7.

Paludo, C.R., Menezes, C., Silva-Junior, E.A., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., Pishchany, G., Khadempour, L., Nascimento, F.S. do, Currie, C.R., Kolter, R., Clardy, J., Pupo, M.T., 2018. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. *Scientific Reports* 8, 1122. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19583-9>

Paludo, C.R., Pishchany, G., Andrade-Dominguez, A., Silva-Junior, E.A., Menezes, C., Nascimento, F.S., Currie, C.R., Kolter, R., Clardy, J., Pupo, M.T., 2019. Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLOS ONE* 14, e0219696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219696>

Pat Fernández, J.M., López López, R., van der Wal, H., Villanueva Gutiérrez, R., 2012. Organización social productiva: situación y perspectiva apícola de la sociedad UNAPINCARE en la Reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche, México. *Región y sociedad* 24, 201–230.

Piccini, C., Antúnez, K., Zunino, P., 2004. An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. *Journal of Apicultural Research* 43, 101–104. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101118>

Pinkus, M., Parra-Tabla, V., Meléndez-Ramírez, V., 2005. Floral resource use and interactions between *Apis mellifera* and native bees in cucurbit crops in Yucatán, México. <https://doi.org/10.4039/n04-043>

Portillo Carrascal, C.Y., 2016. Identificación de levaduras presentes en el proceso de transformación de polen corbicular a pan de abejas por métodos tradicionales y moleculares (PhD Thesis). Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Quezada-Euán JJG; Nates-Parra G; Maués MM; Imperatriz-Fonseca VL; Roubik DW (2018) The economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. *Sociobiology* 65: 534-557.

Quezada-Euán, J.J.G., 2005a. Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, Meliponini). UADY.

Quezada-Euán, J.J.G., May-Itzá, W. de J., González-Acereto, J.A., 2001. Meliponiculture in Mexico: problems and perspective for development. *Bee World* 82, 160–167. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099523>

Reyes-González, A., Ayala, R., Camou-Guerrero, A., 2017. Nuevo registro de abeja sin aguijón del género *Plebeia* (Apidae: Meliponini), en el alto Balsas del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88, 464–466. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.03.018>

Reyes-Novelo, E., Meléndez Ramírez, V., Delfín González, H., Ayala, R., 2009. Abejas silvestres (Hymenoptera: Apoidea) como bioindicadores en el neotrópico. *Tropical and subtropical agroecosystems* 10.

Riera, V 2012 Ápidos. Fauna y flora de Torrent. Consultado: <http://faunayfloradetorrent.blogspot.mx/2012/03/apidos.html> 25-09-2017

Rosa, C.A., Lachance, M.-A., Silva, J.O.C., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y., Martins, R.P., 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Res* 4, 271–275. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9)

Rosano-Hernández, 2011. Los ecosistemas de Campeche y sus recursos microbianos. En *Recursos genéticos microbianos en la Zona Golfo Sureste de México.*, Marcela Gamboa Angulo y Rafael Rojas Herrera. ed. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM) del Sistema de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)., Ed. México.

Roubik D.W. 1989 *Ecology and Natural History of Tropical bees*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.

Roubik, D.W., 2006. Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37, 124–143.
<https://doi.org/10.1051/apido:2006026>

Roulston TH, Goodell K. 2011. The role of resources and risks in regulating wild bee populations. *Annual Review of Entomology* 56:293–312.

Rovira, C. E., Tschirsch, J., & Schvezov, C. 2005. Características y cría de las yateí y otras meliponas. Material de divulgación. Este material ha sido elaborado con los aportes empíricos y técnicos de: Miembros de la Asociación de Productores de Yateí de Misiones (APYM), Fidel Godoy del CEDIT. Sergio Feversani del INTA Oberá. Provincia de Misiones, Argentina.

Sánchez, M. T. C. (2019). Abeja melipona, valorización de una especie ancestral en peligro de extinción. Desarrollo sostenible de zonas áridas y semiáridas frente al cambio climático, 160.

Schwarz, H.F., Bacon, A.L., 1948. Stingless bees (Meliponidae) of the Western Hemisphere: *Lestrimelitta* and the following subgenera of *Trigona*: *Trigona*, *Paratrigona*, *Schwarziana*, *Parapartamona*, *Cephalotrigona*, *Oxytrigona*, *Scaura*, and *Mourella*. *Bulletin of the AMNH*; v. 90.

Segura Campos, M.R., 2015. Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con. *Nutricion Hospitalaria* 1432–1442.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>

Silveira, F., Melo, G., Almeida, E., 2002. Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação.

Sommeijer, M.J., 1999. Beekeeping with stingless bees: A new type of hive. *Bee World* 80, 70–79.

Tej, M.K., Srinivasan, M.R., Vijayakumar, K., Natarajan, N., Kumar, S.M., 2017. Morphometry Analysis of Stingless Bee *Tetragonula iridipennis* Smith (1854). *Int. Journal Current Microbiology Applied Science* 6, 2963–2970.

Torrescano Valle, N. 2010. Estudio de caso Los Petenes de Campeche, Reserva de la Biosfera. *La Biodiversidad en Campeche: estudio de caso*. p. 165-169.

Corby-Harris, V. C. L. A. Snyder, M. R. Schwan, P. Maes, Q. S. McFrederick, K. E. Anderson, Origin and effect of *Acetobacteraceae* Alpha 2.2 in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov. *Applied Environmental Microbiology* 80, 7460–7472 (2014).

Martinson, V. G. J. Moy, N. A. Moran, 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honey bee worker. *Applied Environmental Microbiology* 78, 2830–2840.

Velthuis, H.H.W., Ruttner, F., Crewe, R.M., 1990. Differentiation in reproductive physiology and behaviour during the development of laying worker honey bees, in: Engels, W. (Ed.), *Social Insects: An evolutionary approach to castes and reproduction*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 231–243. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74490-7_10

Villalobos-Zapata, G. J., y J. Mendoza Vega (Coord.), 2010. La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (conabio), Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. México. 730 p.

Villanueva-G, R., Roubik, D.W., Colli-Ucán, W., 2005. Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán peninsula. *Bee World* 86, 35–41. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099651>

Villanueva-Gutiérrez, R., Roubik, D.W., Colli-Ucán, W., Güemez-Ricalde, F.J., Buchmann, S.L., 2013. A Critical View of Colony Losses in Managed Mayan Honey-Making Bees (Apidae: Meliponini) in the Heart of Zona Maya. *Journal of the Kansas Entomological Society* 86, 352–362. <https://doi.org/10.2317/JKES130131.1>

Vit, P., Pedro, S.R., Roubik, D. (Eds.), 2013. Pot-Honey, Texto original: Un legado de abejas sin aguijón. Springer-Verlag, Nueva York.

Kwong W. K., Engel P, H. Koch, N. A. Moran, 2014. Genomics and Host Specialization of Honey Bee and Bumble Bee Gut Symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11509–11514.

Winfrey, R., Williams, N.M., Dushoff, J., Kremen, C., 2007. Native bees provide insurance against ongoing honey bee losses. *Ecology Letters* 10, 1105–1113.

Yoshiyama, M., Kimura, K., 2009. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the Causal Agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 91–96.

Yurrita, C.L., Ortega-Huerta, M.A., Ayala, R., 2017. Distributional Analysis Of Melipona Stingless Bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation. *Apidologie* 48, 247–258.

Zamora, L.G., Arias, M.L., 2011. Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomedica* 22, 59–66.

Zamora-Crescencio, P., Mas, J.-F., Rico-Gray, V., Domínguez-Carrasco, M. del R., Villegas, P., Gutiérrez-Báez, C., Barrientos-Medina, R.C., 2015. Composición y estructura arbórea de petenes en la Reserva de la Biosfera de Los Petenes, Campeche, México. *Polibotánica* 01–19.

CAPÍTULO II. DENSIDAD DE NIDOS DE ABEJAS SIN AGUIJÓN EN DOS SITIOS DENTRO LA RESERVA DE LA BIÓSFERA DE LOS PETENES, CAMPECHE, MÉXICO

INTRODUCCIÓN

Las abejas son un grupo de organismos relevantes por su desempeño en la dinámica de los ecosistemas como polinizadores, tanto de plantas silvestres como cultivadas (Potts *et al.*, 2010). En el mundo existen más de 20,000 especies reconocidas de abejas con gran diversidad de tamaños, hábitos de nidificación, comportamiento y niveles de sociabilidad. Entre ellas se encuentran las abejas sin aguijón (ASA), también conocidas como meliponinos; los cuales carecen de aguijón funcional y pertenecen a la tribu Meliponini de la familia Apidae (Michener, 2000). Estas abejas son el grupo más grande de abejas eusociales de la tierra (Rasmussen y Cameron, 2010), con más de 600 especies descritas en el mundo (Lavinias *et al.*, 2018), distribuidas principalmente en selvas tropicales y subtropicales (Araújo *et al.*, 2004; Hrnir *et al.*, 2016). Actualmente, la mayor diversidad de ASA se encuentra en el Neotrópico (Camargo, 2013). Algunas especies de estas abejas se usan en algunas regiones para producir miel, cerumen y propóleo con fines medicinales (Ayala *et al.*, 2013; Quezada-Euán *et al.*, 2018).

En México se han registrado un total de 11 géneros y 46 especies de ASA, 13 de ellas reconocidas como endémicas. Según lo reportado por Ayala *et al.*, (1996, 1998) y Yáñez-Ordoñez (2008) la mayor diversidad de estas abejas se presenta en el sureste de México. En la Península de Yucatán se han reportado un total de 17 especies y en el estado de Campeche un total de 11, pertenecientes a los géneros

Cephalotrigona, *Melipona*, *Trigona*, *Scaptotrigona*, *Nannotrigona*, *Partamona* y *Friesomelitta* (Ayala *et al.*, 2013). Después de Baja California Sur, Campeche es el estado que posee mayor extensión de Áreas Naturales Protegidas en México (Smardon y Faust, 2006). Entre las áreas protegidas en el estado de Campeche se encuentra la Reserva de la Biosfera de los Petenes (RLBP), con una extensión de 2 828.58 km², en donde se localizan ciertos ambientes denominados petenes, los cuales presentan una alta heterogeneidad, lo que permite la existencia de múltiples hábitats que pueden sostener una elevada biodiversidad global, incluyendo diferentes especies de insectos, entre ellos las abejas sin aguijón (Rosano-Hernández, 2011). El último estudio sobre especies de meliponinos fue realizado por Ayala en 1999 en uno de los 11 municipios que conforman el estado. Según Pat-Fernández *et al.*, (2018) reportaron en comunidades aledañas a la RBLP ocho especies de ASA identificadas como, *Cephalotrigona zexmeniae*, *Frieseomelitta nigra*, *Lestrimellita niitkib*, *Melipona beecheii*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Trigona fulviventris*. Además de estos reportes, no existen estudios sobre la densidad de nidos o registro de especies de ASA dentro de la RBLP, que permitan conocer en un futuro, su respuesta frente a las variaciones y exigencias del medio externo en el que habitan. Por lo tanto, es de gran importancia estudiar la densidad de nidos de estas abejas ya que la información hasta el momento es limitada (Fernández *et al.*, 2010). Por lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar la densidad de nidos y las especies de ASA presentes en dos sitios dentro de la Reserva de la Biósfera de los

Petenes, colindantes con dos municipios del estado de Campeche, México e identificar los sitios de anidación de las especies de ASA encontradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en La Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP), en el estado de Campeche, México, en los municipios de Hecelchakán (Figura 4) y Calkiní (Figura 5). Esta reserva colinda al este, con los municipios de Calkiní, Hecelchakán, Tenabo y Campeche. Se encuentra localizada en la costa norte del estado de Campeche, al sureste del golfo de México en las coordenadas 20°51'30" y 19°49'00" de latitud norte y 90°45'15" y 90°20'00" de longitud oeste de Campeche. Cuenta con una extensión de 2,828.57 km² dividido en dos zonas: una zona terrestre con una extensión de 1,009 km² y una zona marina con una extensión de 1,819 km². El clima en esta zona varía entre cálido subhúmedo con lluvias en verano (Aw) y semiseco y seco cálido; con temperatura anual entre 26.1 a 27.9°C. La precipitación media anual tiene variación entre 725.5 a 1049.7 mm (Toro *et al.*, 2017).

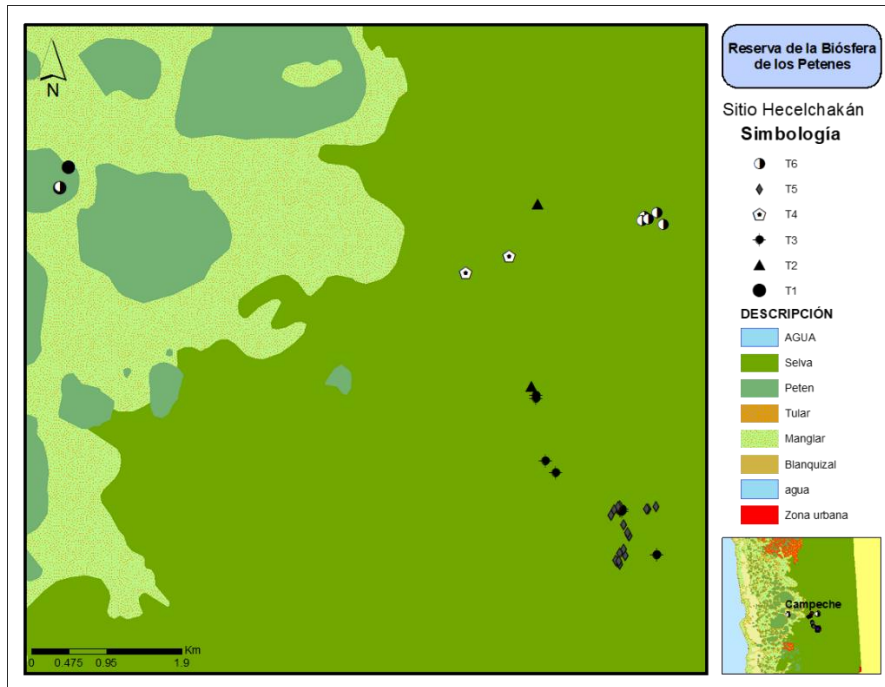


Figura 4. Ubicación del área de estudio. La Reserva de Biosfera de los Petenes, sitio de muestreo, Hechelchakán.

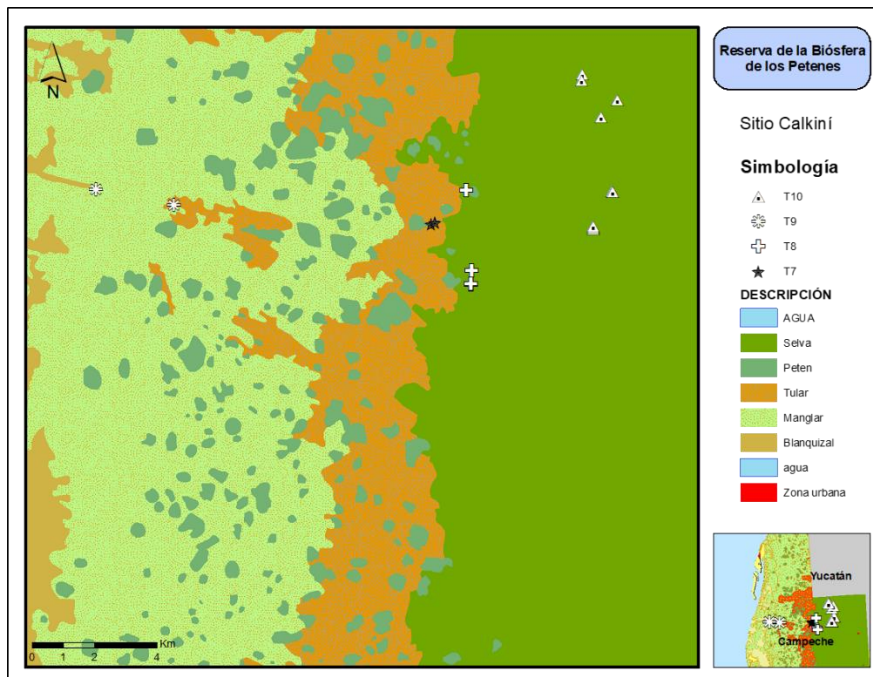


Figura 5. Ubicación del área de estudio. La Reserva de Biosfera de los Petenes, sitio de muestreo, Calkiní.

2.2 Muestreo

Se hicieron recorridos en transectos lineales, determinados por la heterogeneidad del terreno e indicios de tránsito entrópico (Anderson *et al.*, 1979; González, 2006). El periodo de localización de nidos y muestreo de los especímenes miembros del nido, de abejas sin aguijón (ASA), se realizó de enero a mayo del año 2018 con un total de 10 recorridos; 6 en el sitio de Hecelchakán y 4 en el sitio de Calkiní. Los transectos correspondientes al sitio de muestreo Hecelchakán, fueron identificados por claves numéricas del 1 al 6. En el sitio de muestreo Calkiní, se realizaron los transectos identificados con clave del 7 al 10. La distancia promedio entre los transectos fue de 1.5 km. Los recorridos se hicieron en horario de 7:00 a.m. a 4:00 p.m., estimando el periodo en el que tienen mayor actividad las abejas sin aguijón (ASA). La colecta de los ejemplares de ASA se llevó a cabo con una pequeña red entomológica con tela de tul. El diámetro de la red fue de 12 cm por 20 cm de profundidad. Estas fueron colocadas en la entrada de los nidos para asegurar que las abejas colectadas pertenecieran al mismo. Se registró el nombre científico del árbol donde se encontraba cada nido y también la posición geográfica por medio de un receptor GPS marca Garmin, modelo ETrex 20x. Se conservaron 5 ejemplares de cada nido para la identificación de la especie. Las abejas se conservaron en microtubos con etanol al 96% y se transportaron en una nevera a temperatura baja al laboratorio de Microbiología y Fitopatología Agrícola del Colegio de Postgraduados Campus Campeche.

El área de estudio total y la densidad de anidación por hectárea se calcularon con los datos de posición geográfica y el software ArcMap 10.1. Con el fin de obtener

datos cuantitativos de los árboles que las abejas utilizaron como sitio de anidación a lo largo de los transectos.

2.3 Identificación taxonómica.

Las abejas fueron montadas en alfileres entomológicos número 0 marca BioQuip products y número 1 y 2 marca ENTOKRYSIS para su identificación, y fueron guardadas en cajas tipo Smith. La identificación taxonómica hasta especie fue realizada con la ayuda de claves taxonómicas (Ayala, 1999; Camargo y Moure, 1994), con un microscopio estereoscópico STEMI DV4 Marca CARL ZEISS en colaboración con el Dr. José Javier Quezada Euán y el M. en C. Humberto Moo Valle, del Departamento de Apicultura Tropical de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Yucatán.

RESULTADOS

3.1 Nidos de especies encontradas de abejas sin aguijón en la Reserva de la Biosfera de los Petenes.

En total se localizaron 56 nidos de abejas sin aguijón (ASA), 41 en el sitio Hecelchakán y 15 en el sitio Calkiní. Los nidos encontrados correspondieron a ocho especies: *Cephalotrigona zexmeniae*, *Frieseomelitta nigra*, *Lestrimelitta niitkib*, *Nannotrigona perilampoides*, *Partamona bilineata*, *Plebeia frontalis*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Trigona fulviventris* (Cuadro 5). En Hecelchakán se identificó la presencia de nidos de seis especies y las especies *C. zexmeniae*, *L. niitkib* y *T. fulviventris* fueron exclusivas de este sitio. En el sitio Calkiní se hallaron cinco especies del total mencionado (Cuadro 5), y se determinó a *N. perilampoides* y *P. bilineata*, como exclusivas del sitio.

Cuadro 5. Número y densidad de nidos por especie de abejas sin aguijón localizados en los sitios de muestreo establecidos dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes.

Especie	Hecelchakán	Calkiní
<i>Cephalotrigona zexmeniae</i>	1	0
<i>Frieseomelitta nigra</i>	20	3
<i>Lestrimelitta niitkib</i>	1	0
<i>Nannotrigona perilampoides</i>	0	1
<i>Partamona bilineata</i>	0	1
<i>Plebeia frontalis</i>	3	8
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	14	2
<i>Trigona fulviventris</i>	2	0
TOTAL	41	15
Densidad de nidos	2.15	0.19

Hecelchakán (sitio 1), Calkiní (sitio 2)

En este estudio se encontró una densidad por hectárea en el sitio Hecelchakán de 2.15 nidos por ha y de 0.19 nidos por ha en el sitio de Calkiní. Las especies con mayor número de nidos localizados (considerando ambos sitios) correspondieron a *F. nigra* (n=23) con un 41%, seguida por *S. pectoralis* (n=16) con un 29% y *P. frontalis* (n=1) con un 20%. En Hecelchakán la especie con mayor número de nidos correspondió a *F. nigra* (n=20), localizada en los transectos 3, 5, 6 y 10; mientras que en Calkiní *P. frontalis* (n= 8) se localizó en los transectos 1, 3, 6, 8 y 10.

3.2 Sustratos de anidación de las abejas sin aguijón

El muestreo permitió observar que las diferentes especies de abejas sin aguijón (ASA) presentan diferentes preferencias de anidación en las especies arbóreas de la Reserva de la Biósfera de los Petenes. En este estudio se identificaron un total de 16 especies arbóreas entre las que se encuentran, *Avicennia germinans*, *Bursera simaruba*, *Caesalpinia mollis*, *Chryosophyllum cainito*, *Citrus X sinensis*, *Crescentia cujete*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Haematoxylum campechianum*, *Lysiloma latisiliquum*, *Metopium brownei*, *Piscidia piscipula*, *Populus sp.*, *Trichilia americana*, *Vitex gaumeri* y *Coccoloba cozumelensis*. El 32% de los nidos (n=18) se encontraron en *C. cujete*, además, cuatro de las ocho especies de ASA identificadas (*F. nigra*, *N. perilampoides*, *P. frontalis* y *S. pectoralis*) construyeron su nido en esta especie vegetal. La especie arbórea *Lysiloma latisiliquum* fue la segunda especie más utilizada para anidación (n=5) por tres especies diferentes de ASA, *C. zexmeniae*, *F. nigra* y *S. pectoralis* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Especies de árboles usados como sitios de establecimiento de colonias de Abejas Sin Aguijón, en la Reserva de la Biósfera de los Petenes para el sitio Hecelchakán.

Especie arbórea	Especie de abeja sin aguijón							Total de nidos por especie arbórea
	Cz	Fn	Ln	Np	Pb	Pf	Sp	
<i>Avicennia germinans</i> (L.) L.						4		4
<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.							1	1
<i>Caesalpinia mollis</i> (Kunth) Spreng.		1						1
<i>Chryosophyllum cainito</i> L.					1			1
<i>Citrus X sinensis</i> Osbeck		1						1
<i>Crescentia cujete</i> L.		8		1		4	5	18
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Jacq.) Griseb.		1						1
<i>Haematoxylum campechianum</i> L.			1					1
<i>Lysiloma latisiliquum</i> (L.) Benth.	1	2					2	5
<i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urb.		1						1
<i>Piscidia piscipula</i> Sarg.							3	3
<i>Populus</i> L.							1	1
<i>Trichilia americana</i> (Sessé y Moc.)							1	1
<i>Vitex gaumeri</i> Greenm.		2					1	3
<i>Coccoloba cozumelensis</i> Hemsl.						2		2
N.D.		4				1	1	6
Total de nidos por especie	1	20	1	1	1	11	15	50

Cz: *Cephalotrigona zexmeniae*, Fn: *Frieseomelitta nigra*, Ln: *Lestrimellita niitkib*, Np: *Nanotrigona perilampoides*, Pb: *Partamona bilineata*, Pf: *Plebeia frontalis*, Sp: *Scaptotrigona pectoralis*, Tf: *Trigona fulviventris*, N.D.: No determinado. ASA: Abeja sin aguijón.

Por otro lado, se identificaron nidos en construcciones antiguas y estas correspondieron a *F. nigra* y *S. pectoralis* (Figura 6). Se localizaron en muros y construcciones de iglesias situadas dentro de la RBLP desde hace más de siglo y

medio aproximadamente. Asimismo, debido a su hábito de anidación, los nidos de *T. fulviventris* fueron localizados en cavidades en el suelo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Frecuencia de nidos localizados en ruinas de hacienda localizada en la Reserva de la Biósfera de los Petenes.

Lugar de anidación	Especie de abeja sin aguijón							Total de nidos por sustrato	
	Cz	Fn	Ln	Np	Pb	Pf	Sp		Tf
Suelo		0						2	2
Muro		1					1		2
Interior iglesia		1							1
Ruina iglesia		1							1
Total de nidos por especie	0	3	0	0	0	0	1	2	6

Cz: *Cephalotrigona zexmeniae*, Fn: *Frieseomelitta nigra*, Ln: *Lestrimellita niitkib*, Np: *Nanotrigona perilampoides*, Pb: *Partamona bilineata*, Pf: *Plebeia frontalis*, Sp: *Scaptotrigona pectoralis*, Tf: *Trigona fulviventris*, N.D.: No determinado.

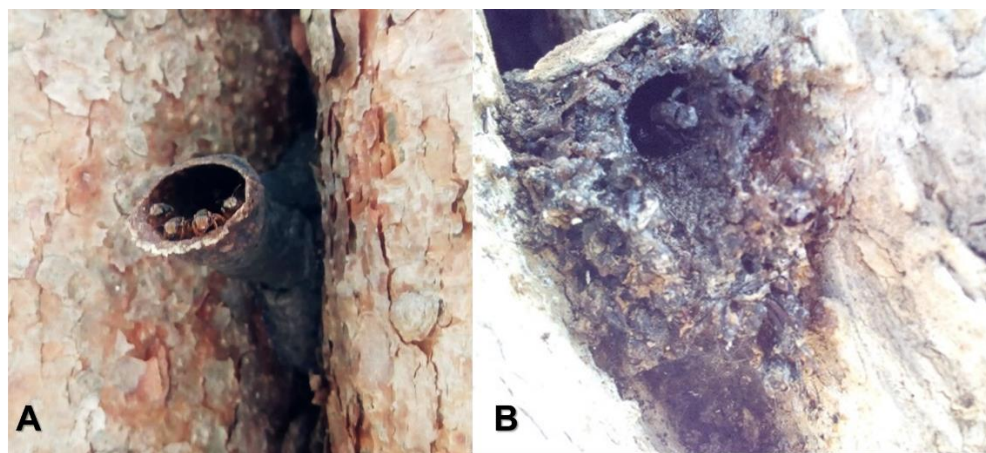


Figura 6. Entradas de nido en sitio Hecelchakán. A: Guardianas en entrada de nido de *Scaptotrigona pectoralis* en árbol de Chaká (*B. simaruba*), B: Centinela en entrada de nido de *Frieseomelitta nigra* en árbol de Jícara (*C. cujete*).

DISCUSIÓN

Las diferentes especies de abejas sin aguijón (ASA) presentan una gran variedad de estilos de vida y ecología (Martínez-lópez *et al.*, 2017). Pueden establecer sus colonias de forma silvestre en árboles, o bien, en lugares perturbados, en estructuras de edificios, cementerios y parques (Nates-Parra *et al.*, 2006). Su distribución en los trópicos es amplia, sin embargo, la riqueza y diversidad de las especies varía de acuerdo con la región y ecosistema en que se establezcan. Esto es porque su comportamiento está limitado por la disponibilidad de recursos y los cambios que son provocados al ambiente. Es por esto que los estudios sobre la diversidad, nidificación de las colonias y su relación a su respuesta frente a las variaciones y exigencias del medio externo, son de gran importancia, debido a que crean las bases para plantear estrategias de conservación (Vergara *et al.*, 1986).

En este estudio se determinaron las especies de abejas sin aguijón (ASA) presentes en dos sitios colindantes con los municipios de Hecelchakán y Calkiní en el estado de Campeche ubicados dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes. El muestreo permitió identificar ocho especies de ASA, previamente reportadas para el estado (Ayala *et al.*, 2013). No se encontró nuevas especies dentro de la RBLP. Por otro lado, no se encontró la presencia de nidos de *M. beecheii* a diferencia de lo reportado por Pat-Fernández *et al.*, (2018) en comunidades aledañas a la RBLP. Esto puede deberse a que esta especie se establece preferentemente en hábitats conservados (Quezada-Euán, 2018). Otro factor podría ser el saqueo de nidos *M. beecheii* para domesticación, ya que las comunidades aledañas a la RBLP son caracterizadas como zonas dedicadas a la

meliponicultura. A pesar de estos resultados, en este trabajo se encontró la presencia de nidos de *P. frontalis* la cual no fue reportado por Pat-Fernández *et al.* (2018) en las comunidades aledañas a la RBLP.

Por otro lado, en este estudio la especies con mayor número de nidos en la RBLP, correspondieron a *F. nigra* y *S. pectoralis*. Esta última especie fue reportada como una de las más abundantes en el Cerro, El Hacha, en la región norte de Guanacaste, Costa Rica (Elizondo *et al.*, 2014). Esta especie al igual que *F. nigra* poseen la capacidad de adaptarse a las condiciones y disponibilidad de recursos.

En cuanto a la nidificación el recurso que más utilizaron las ASA fueron las cavidades arbóreas (Martínez-López *et al.*, 2017) y el número de sustratos que utilizan puede variar entre especies de abejas. Los sitios de nidificación de ASA en las selvas del sureste de México están representados por una gran variedad de árboles. Estas especies vegetales presentan diámetros de 1.04–2.22 metros, como promedios en sus troncos a la altura del pecho; en los cuales las ASA crean cavidades naturales para sus nidos. Del mismo modo, son capaces de hacer nidos completamente subterráneos; de hasta cuatro metros bajo la tierra, o completamente expuestos. También, se establecen en pendientes de ramas de árboles dependiendo de cada especie (Nates-Parra, 2001). En la RBLP, el 89% de las especies de ASA localizadas tuvieron preferencias de anidación en especies vegetales. En la literatura se han reportado que especies como *Paratrigona isopterophila*, *Scaptotrigona limae* y *T. fulviventris* nidifican en un solo sustrato, principalmente cavidades de árboles (Nates-Parra y Cepeda, 1983; Vergara *et al.*, 1986), mientras que otras, como *Nannotrigona*, pueden construir tanto en cavidades

de árboles como grietas de edificaciones (Martínez-lópez *et al.* 2017). En la RBLP se encontró nidos de *T. fulviventris* en cavidades del suelo, coincidiendo con lo reportado por Jarau y Barth (2008) y Elizondo *et al.*, (2014).

El recurso vegetal con mayor uso para el establecimiento de nidos de ASA localizados dentro de la RBLP correspondió a la especie *Crescentia cujete* perteneciente a la familia de la bignonáceas. Esta especie vegetal brinda las condiciones necesarias para el establecimiento de colonias debido al tamaño que puede desarrollar dentro de la RBLP y su capacidad de resistir condiciones ambientales desfavorables, como inundaciones o sequía. De igual forma, su predominancia en el hábitat promueve el uso de este sustrato para que las ASA establezcan sus nidos (Antonini y Martins, 2003). Asimismo, a su abundancia de flores con olor atractivo para las ASA, las cuales proveen de néctar y polen como recursos esenciales para el desarrollo y manutención de la colmena. En un trabajo previo, Moreno y Cardozo (1997) reportaron a la especie vegetal *Bursera simaruba* como la especie vegetal nativa más importante para la nidificación de *M. beecheii* en Costa Rica. Contrario a estos resultados, en la RBLP *B. simaruba* forma parte de las especies vegetales menos frecuentes, debido a que albergó un solo nido de *S. pectoralis*. Se ha reportado que algunas especies de ASA pueden no presentar preferencias en el recurso vegetal de nidificación (Biesmeijer *et al.*, 2006), sin embargo, en nuestro estudio las especies *F. nigra* y *S. pectoralis* encontradas en la RBLP presentaron cierta especificidad de nidificación en *C. cujete*.

En el sitio Hecelchakán, se localizaron nidos de ASA establecidas en estructuras de construcciones de antiguos asentamientos dentro de la RBLP a causa del

decremento en el uso de sustratos naturales y la búsqueda de asentamientos humanos como nuevos nichos para la nidificación, lo que sugiere el incremento de perturbación antropogénica que cada día se vuelven más frecuentes en estos hábitats (Garibaldi *et al.*, 2012; Nates-Parra *et al.*, 2008). Asimismo, se observó que en la RBLP los hábitos de nidificación igual están influenciados por factores relacionadas con el tipo de hábitat. La RBLP está conformada en su mayoría por sitios, conocidos como marismas, los cuales en el periodo de lluvias alcanzan profundidades de inundación a una altura mayor a un metro (Villalobos-Zapata y Mendoza-Vega, 2010). De los dos sitios de muestreo, Calkiní está conformado por zonas con mayor número de superficies inundables, debido a su alta proximidad al mar y como consecuencia de ello, especies como *T. fulviventris* que son subterráneas (Ayala, 2016), no se encontraron en este sitio, a pesar de que estas especies son de amplia distribución (Quezada-Euán, 2005).

En cuanto a la densidad de nidos en la RBLP, el sitio Hecelchakán demostró un mayor número de nidos en comparación con Calkiní, sin embargo, el número de nidos encontrados en ambos sitios por hectárea fue bajo comparados con otros autores, donde la densidad de nidos de ASA silvestres es 6 a 8 nidos por hectárea (Batista *et al.*, 2001; Eltz *et al.*, 2002). Por su parte, Eltz *et al.*, (2002) reportaron una alta densidad en las zonas de manglar con valores de 8.4 nidos por hectárea. En la RBLP no se localizaron nidos establecidos en la zona de manglares. Esto puede deberse debido a que gran parte de la zona de manglar está conformada en su mayoría por plantas jóvenes que forman parte de los planes de reforestación por pérdidas de más del 15.2 % en cobertura del mangle (Gómez Ramírez, 2013) como

consecuencia de las actividades antropogénicas y los eventos hidrometeorológicos (Hernández-Félix et al, 2017). Por lo tanto, las plantas dentro de la RBLP que pertenecen al plan de reforestación de mangle aún no poseen las medidas adecuadas para el establecimiento de nidos de ASA. Estos resultados podrían indicar que la explotación, las actividades antropogénicas y los eventos meteorológicos en la Reserva de la RBLP podrían estar afectando la anidación de las ASA de manera silvestre al reducir los sustratos de anidación afectando la densidad y diversidad de las especies. Por lo tanto, este estudio permite establecer las bases para futuros estudios sobre la diversidad, distribución y el riesgo de las abejas ASA en esta Reserva que permitan establecer estrategias para su conservación.

CONCLUSIÓN

Los nidos de abejas sin aguijón (ASA) localizados dentro de la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP) pertenecieron a especies ya reportadas con anterioridad en el estado de Campeche. Las ASA *Frieseomelitta nigra* y *Scaptotrigona pectoralis* fueron las especies con mayor frecuencia encontrada en la RBLP debido a que parecen tener una mejor capacidad adaptativa al anidar en cualquier tipo de sustrato. *Crescentia cujete* fue la especie arbórea con mayor preferencia para el establecimiento de nidos en las diferentes especies de ASA encontradas, debió a su predominancia en el hábitat como consecuencia de su capacidad de crecer en sitios inundables, presentar resistencia a sequía y su floración abundante.

LITERATURA CITADA

Anderson, D.R., Laake, J.L., Crain, B.R., Burnham, K.P., 1979. Guidelines for Line Transect Sampling of Biological Populations. *The Journal of Wildlife Management* 43, 70–78. <https://doi.org/10.2307/3800636>

Araújo, E.D., Costa, M., Chaud-Netto, J., Fowler, H.G., 2004. Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible ecological implications. *Brazilian Journal of Biology* 64, 563–568. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000400003>.

Arnold, Noemi, Ayala, Ricardo, Mérida, Jorge, Sagot, Philippe, Aldasoro, Miriam, y Vandame, Rémy. (2018). New records of stingless bees (Apidae: Meliponini) for the Mexican states of Chiapas and Oaxaca. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(3), 651-665. <https://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.3.2429>

Ayala, R., 2016. Abejas (Apoidea). in: *La Biodiversidad en Colima. Estudio de Estado*. pp. 331–245.

Ayala, R., Gonzalez, V.H., Engel, M.S., 2013. Mexican Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, Distribution, and Indigenous Knowledge, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D. (Eds.), *Pot-Honey*. Springer New York, New York, NY, pp. 135–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9

Ayala, R., Griswold, T. L. y Bullock, S. H. (1998). Las abejas nativas de México. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (Eds.), *Diversidad biológica de México, orígenes y distribución* (pp. 179–225). México D.F.: Instituto de Biología, UNAM. Oaxaca.

Ayala, R., Griswold, T. L. y Yanega, D. (1996). Apoidea (Hymenoptera). En J. Llorente-Bousquets, A. N. García-Aldrete y E. González-Soriano (Eds.), *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento* (pp. 423–464). México D.F.: UNAM/ Conabio.

Brosi Berry J., Daily Gretchen C., Ehrlich Paul R., 2007. Bee community shifts with landscape context in a tropical countryside. *Ecological Applications* 17, 418–430. <https://doi.org/10.1890/06-0029>

Cairns, Christine, Rogel Villanueva, Suzanne Koptur y David Bray (2005) “Bee Populations, Forest Disturbance, and Africanization in Mexico”, *Biotropica*, 37 (4): 686-692. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2005.00087.x

Calderone, N.W., 2012. Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>

Camargo JMF (2013) Historical biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical region. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D (eds) *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp 19–34.

Elizondo, A. I. B., Monge, I. A., Cartín, A. L. M., Sánchez, G. H., Toruño, H. S., Flores, W. M., y Montano, I. M. (2019). Asociación entre abejas sin aguijón (Apidae, Meliponini) y la flora del bosque seco en la región norte de Guanacaste, Costa Rica. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 70-91.

Eltz, T., Brühl, C. A., Van der Kaars, S., y Linsenmair, E. K. (2002). Determinants of stingless bee nest density in lowland dipterocarp forests of Sabah, Malaysia. *Oecologia*, 131(1), 27-34.

Fierro, M. M., Cruz-Lopez, L., Sanchez, D., Villanueva-Gutierrez, R., y Vandame, R. (2012). Effect of biotic factors on the spatial distribution of stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) in fragmented neotropical habitats. *Neotropical Entomology*, 41(2), 95-104.

Garibaldi, L., Morales, C., Ashworth, L., Chacoff, N., Aizen, M., 2012. Los polinizadores en la agricultura. *Ciencia Hoy* 21, 34–43.

González, A.R., 2006. *Ecología: métodos de muestreo y análisis de poblaciones y comunidades*. Pontificia Universidad Javeriana.

Gonzalez-Acereto, J.A., 2012. La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrocencias, México* 34–41.

Hernández-Félix, Lourdes, Molina-Rosales, Dolores, y Agraz-Hernández, Claudia. (2017). Servicios ecosistémicos y estrategias de conservación en el manglar de Isla Arena. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 14(3), 427-449.

Hrncir, M., Jarau, S., y Barth, F. G. (2016). Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A* (2016) 202: 597. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1117-9>

Jaapar, MF, Halim, M., Mispan, MR, Jajuli, R., Saranum, MM, Zainuddin, MY y Ghani, IA (2016). La diversidad y abundancia de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) en Malasia peninsular. *Avances en biología ambiental* 10 (9), 1-8.

Jarau, S., y Barth, F. G. (2008). Stingless bees of the Golfo Dulce region, Costa Rica (Hymenoptera, Apidae, Apidae, Meliponini). *Zugleich Kataloge der oberösterreichischen Landesmuseen*, 80, 267-276

Lavinas, F. C., Macedo, E. H. B., Sá, G. B., Amaral, A. C. F., Silva, J. R., Azevedo, M. M., y Rodrigues, I. A. (2018). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

Martinez Lopez, Sergio; Soto Medina, Edier Alberto; Sandoval Arango, Stephania y Otero Ospina, Joel Tupac. Distribución espacial y hábitos de nidificación de *Nannotrigona mellaria* (Apidae: Meliponini) en una localidad de Cali (Colombia). *Acta Zool. Mex [online]*. 2017, vol.33, n.2, pp.161-168. ISSN 2448-8445.

Michener CD (2007) *The bees of the world*, 2nd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore

Michener CD (2013) *The Meliponini*. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D (eds) *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp 3–17.

Nates-Parra, G., 2001. Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana* 17.

Nates-Parra, G., Palacios, E., Parra-H, A., 2008. Efecto del cambio del paisaje en la estructura de la comunidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae) en Meta, Colombia. *Revista de Biología Tropical* 56, 1295–1308.

Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida a criação de abelhas indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Editora Nogueirapis.

Pat Fernández, L. A., Anguebes Franceschi, F., Pat Fernández, J. M., Hernández Bahena, P., y Ramos Reyes, R. (2018). Condición y perspectivas de la meliponicultura en comunidades mayas de la reserva de la biósfera Los Petenes, Campeche, México. *Estudios de cultura maya*, 52, 227-254.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology y Evolution* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Quezada-Euán, J. J. G. (2018). *Stingless Bees of Mexico: The Biology Management And Conservation Of An Ancient Heritage*. Cham, CH: Springer.

Ramírez Freire, L., Alanís Flores, G., Ayala Barajas, R., Velazco Macías, C., Favela Lara, S., 2014. El uso de platos trampa y red entomológica en la captura de abejas nativas en el estado de Nuevo León, México. *AZM* 30. <https://doi.org/10.21829/azm.2014.30375>

Rasmussen, C., Cameron, S.A., 2010. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society* 99, 206–232. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01341.x>

Rosano-Hernández, 2011. Los ecosistemas de Campeche y sus recursos microbianos. En Recursos genéticos microbianos en la Zona Golfo Sureste de México., Marcela Gamboa Angulo y Rafael Rojas Herrera. ed. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM) del Sistema de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)., Ed. México.

Samejima, H., Marzuki, M., Nagamitsu, T., y Nakasizuka, T. (2004). The effects of human disturbance on a stingless bee community in a tropical rainforest. *Biological Conservation*, 120(4), 577-587.

Slaa, E. J., Sánchez-Chaves, L. A., Malagodi-Braga, K. S. y Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37, 293–315.

Smardon R. y Faust B., (2006) Introduction: International policy in the biosphere reserves of Mexico's Yucatán península. *Landscape and urban planning*. Vol. 74 pp. 160-192

Toro-Ramírez, Alejandra, Sosa-López, Atahualpa, Ayala-Pérez, Luis Amado, Pech, Daniel, Hinojosa-Garro, Demian, y Del Río-Rodríguez, Rodolfo. (2017). Abundancia y diversidad de la ictiofauna en la Reserva de la Biósfera Los Petenes, Campeche, México: asociaciones con los ciclos nictimerales y las épocas climáticas. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2), 311-321.

Vergara, C., Villa, A. y Nates, G. (1986). Nidificación de meliponinos (Hymenoptera: Apidae) de la región central de Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 34, 181-184.

Vieira, K. M., Netto, P., Amaral, D. L., Mendes, S. S., Castro, L. C., y Prezoto, F. (2016). Nesting stingless bees in urban areas: a reevaluation after eight years. *Sociobiology*, 63(3), 976-981.

Yáñez-Ordóñez, O., Trujano-Ortega, M. y Llorente-Bousquets, J. (2008). Patrones de distribución de las especies de la tribu Meliponini (Hymenoptera: Apoidea: Apidae) en México. *Interciencia*, 33, 41–45.

CAPÍTULO III MICROORGANISMOS AISLADOS DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN *Scaptotrigona pectoralis* Y *Frieseomelitta nigra*

INTRODUCCIÓN

La simbiosis es un proceso común en la naturaleza, en el caso de los simbioses evolucionan para beneficiarse mutuamente (Vásquez *et al.*, 2012). Los animales incluidos los insectos establecen asociaciones simbióticas con diversas comunidades de microorganismos comúnmente conocido como microbioma (Anderson *et al.*, 2013; Feldhaar y Gross, 2009). Las abejas son insectos colonizadas por una diversa gama de microorganismos incluidas bacterias, hongos, protozoarios y virus que conforman su microbioma (Kwong y Moran, 2016; Villegas-Plazas *et al.*, 2018). La microbiota es considerada de gran importancia para la salud del sistema inmunitario, digestivo y del bienestar general de las abejas, ya que pueden proporcionar a sus hospederos aminoácidos esenciales, vitaminas, nutrientes y enzimas que facilitan la digestión y la obtención de energía (Anderson *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2009). Por ejemplo, se sabe que la conversión del polen en pan de abeja es el resultado de la acción microbiana, donde básicamente ocurre una fermentación ácido láctica por acción de bacterias y levaduras, con actividad proteolítica y lipolítica y otros procesos enzimáticos (del Risco-Rios *et al.*, 2012).

Debido a la creciente disminución de polinizadores en el mundo (Potts *et al.*, 2010; Winfree *et al.*, 2011), es de gran importancia realizar estudios que ayuden a entender las funciones ecológicas de los microorganismos en la nutrición y desarrollo de las abejas, para plantear estrategias de reproducción sustentable que

permitan su conservación. Las abejas sin aguijón (ASA) son el grupo de insectos polinizadores más grande ya que están presentes en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Brown y Oliveira, 2014; Michener, 2007), sin embargo, existen pocos estudios en cuanto a los microorganismos aislados de ellas; actualmente, la microbiota de la abeja europea *Apis mellifera* es el más estudiado (Bonilla-Rosso *et al.*, 2018; Olofsson y Vásquez, 2008; Olofsson *et al.*, 2011; Piccini *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2012). Los estudios principalmente se centran en la identificación de los microorganismos de *Apis mellifera* (Barbosa *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2017; Leonhardt y Kaltenpoth, 2014; Rosa *et al.*, 2003, Rosa y Lachance, 2005; Teixeira *et al.*, 2003), mientras que muy pocas son las contribuciones en abejas sin aguijón (Menezes *et al.*, 2015; Paludo *et al.*, 2018; Paludo *et al.*, 2019). Por ejemplo, se ha descubierto una fuerte asociación simbiótica entre *Scaptotrigina depilis* y el hongo *Monascus* (Ascomycotina) al observar una baja supervivencia de las larvas cuando estas no consumían al hongo en su alimento larvario (Menezes *et al.*, 2015). Por otra parte, Paludo *et al.* (2018) reportó que el hongo *Zygosaccharomyces* sp. es capaz de producir esteroides que regulan el desarrollo larval de *S. depilis*. Más tarde, este mismo autor informó de una asociación tripartita conformada por *Zygosaccharomyces* sp., *Monascus ruber* y *Candida* sp. Estos dos últimos microorganismos controlan las poblaciones de *Zygosaccharomyces* sp. mediante la producción de compuestos volátiles para su desarrollo, o bien, lovastatina para inhibir su crecimiento (Paludo *et al.*, 2019). Por otro lado, en un estudio realizado en la ASA *Heterotrigona itama* se aislaron a partir de miel, polen y propóleo cuatro cepas de *Bacillus* con actividad proteolítica,

lipolítica y celulolítica con importantes aplicaciones biotecnológicas (Ngalimat *et al.*, 2019).

Actualmente, los estudios realizados sobre el papel de los microorganismos en ASA son insuficientes. *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra* son especies de ASA que presentan una amplia adaptabilidad a diversos ambientes por lo que son consideradas con potencial en la meliponicultura (Aguilar *et al.*, 2013; Ayala *et al.*, 2013). Ambas especies de ASA fueron identificadas como las más abundantes en los muestreos realizados en el Área Natural Protegida conocida como la Reserva de la Biosfera de los Petenes (RBLP). Aunado a ello, y con la finalidad de contribuir a general conocimiento de estas especies, este trabajo tiene por objetivo aislar y caracterizar la microbiota interna y externa asociada a las ASA *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra* y evaluar la funcionalidad enzimática de los aislados obtenidos mediante medios selectivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colecta de las abejas sin aguijón *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*

Las especies de Abejas Sin Aguijón (ASA) *S. pectoralis* y *F. nigra* utilizadas para el aislamiento de los microorganismos fueron colectados en la Reserva de la Biosfera de los Petenes (RBLP) en Campeche México. Para este estudio se seleccionaron tres nidos de *S. pectoralis* (denominados P1, N15 y N13) y tres de *F. nigra* (N1-24, N12-24 y N13-24) (Cuadro 8). Los nidos fueron seleccionados debido a que existía una distancia mayor entre ellos (mayor a 4 km) o bien cuando la vegetación en el sitio donde se encontraba el nido era diferente, ya que estos factores podrían influir para presentar diferencias en su microbiota.

Cuadro 8. Ubicación geográfica de los nidos muestreados para el aislamiento de microorganismos asociados a las especies de abejas sin aguijón *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*, en la Reserva de la Biosfera de los Petenes.

Especie	Nido	Coordenadas	Altitud (msnm)
<i>F. nigra</i>	N1-24	20.546731N 90.294292W	3.9m
	N12-24	20.536912N 90.299713W	4m
	N13-24	20.537372N 90.299755W	6.6m
<i>S. pectoralis</i>	P1	20.170154N 90.330735W	7m
	N13	20.168590N 90.316033W	7m
	N15	20.132766N 90.321034W	7m

La captura de especímenes de las abejas se realizó colocando un tubo cónico de 50 mL estéril (Figura 7) en la entrada del nido. Se tomó un total de 60 abejas por cada nido y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología y Microbiología

Agrícola, del Colegio de Postgraduados, Campus Campeche en una nevera con hielo para causar el aletargamiento de las abejas y mantener estable la microbiota hasta su aislamiento.



Figura 7. Colecta de abejas para aislamiento de microbiota interna y externa, en la entrada de nido de la especie de ASA *Frieseomelitta. nigra*.

2.2 Estandarización del proceso de aislamiento de la microbiota interna de las abejas sin aguijón *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*

Para el aislamiento de la microbiota interna se realizó la estandarización de un método de desinfestación externa eficiente de las abejas, debido a la falta de protocolos para el aislamiento de estos microorganismos internos en estas especies de tamaño pequeño. Para ello, se procedió a consultar en la literatura diferentes procedimientos de desinfestación en insectos (Cuadro 9). En total se realizaron nueve tratamientos (Cuadro 9) hasta seleccionar un método eficiente de desinfestación de las abejas, que se obtuvo cuando se observaba nulo crecimiento microbiano en los medios, al realizar la impresión de las abejas en el medio de cultivo (colocar la abeja después del proceso de desinfestación y presionarla sobre

el medio de cultivo) o bien, al colocar la solución salina del lavado de las abejas, usada para su desinfestación, en medio de cultivo.

Cuadro 9. Tratamientos empleados para estandarizar la desinfestación de las abejas *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra* de la Reserva de la Biosfera de los Petenes, para el aislamiento de sus microorganismos internos asociados, con base en estudios en otros insectos.

Tratamiento probado	Referencia	Insecto
Hipoclorito de sodio 0.4% por 1 min.		
Etanol 67.2%	Kumar et. al.,2014, Dantur et. al., 2015, Gandotra et. al., 2016, Almeida et. al., 2017	<i>O. velox</i> , <i>A. miliaris</i> and <i>P. quatuordecimpunctata</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Lepidópteros</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> .
Etanol 67.2 % + Hipoclorito de sodio 0.4 %		
Etanol 75% + Hipoclorito de sodio 2%	Davidson et. al.,1994, Gai et. al., 2010	<i>Bemesia Argentifolii</i>
Etanol 80% por 1 min. + Hipoclorito de sodio 0.4 % por 1 min.		
Etanol 92.18% + Hipoclorito de sodio 0.4%		
Etanol 96% por 1.5 min	Kenneth et. al., 2014	<i>Gypsy Moth</i>
Etanol 96% + Hipoclorito de sodio 5%		

2.3 Aislamiento y purificación de microorganismos de la microbiota interna y externa de *S. pectoralis* y *F. nigra*.

El aislamiento de los microorganismos de *S. pectoralis* y *F. nigra* se realizó mediante la técnica de dilución seriada. Para el aislamiento de los microorganismos de la microbiota interna se tomaron un total de 25 abejas y se desinfestaron externamente con etanol 96% e hipoclorito de sodio 5%. Las abejas desinfestadas se colocaron en un tubo de ensaye y se maceraron con una varilla esteril. Posteriormente, se agitó con un vortex por 3 min y se depositó 1 mL en otro tubo de ensaye con el mismo volumen de solución salina esteril. Este proceso se repitió cinco veces para obtener las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Posteriormente, se depositó 100 μ l de la dilución 10^{-3} . Con la ayuda de una espátula Drigalsky esteril se distribuyó homogéneamente los 100 μ l de cada dilución en placas Petri con medio. Los medios utilizados fueron, agar nutritivo (AN), papa dextrosa agar (PDA) para las pruebas de estandarización del protocolo de desinfestación en ASA del meliponario del CP, Campus Campeche. Luria Bertani (LB), Czapek Dox (CZ) y extracto de malta (EM), en la prueba de diferentes protocolos de desinfestación externa de ASA de la RBLP y para aislar la mayor diversidad de microorganismos. Se utilizaron como controles de desinfestación la impresión de las abejas y del agua esteril del último lavado de las abejas, en cajas Petri con medio. Las placas se realizaron por triplicado y se incubaron a 37°C durante 72 horas. El conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizó cada 24 horas por 72 horas.

El aislamiento de la microbiota externa se realizó mediante la inmersión de 25 abejas de cada especie de ASA en 1.5 mL de solución salina esteril al 0.85%.

Posteriormente, se tomó 1 mL y se depositó en 9 mL de solución salina para realizar las diluciones seriadas como se describen arriba. Se utilizó la dilución 10^{-3} para el cultivo de la microbiota externa en los mismos medios y tiempo de incubación utilizados para la microbiota interna. Asimismo, las placas se realizaron por triplicado y se incubaron a 37°C durante 72 horas. El conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se realizó cada 24 horas por 72 horas. Las colonias obtenidas en ambos aislamientos, se purificaron mediante subcultivos utilizando la técnica de estría hasta obtener cultivo axénicos.

2.4 Caracterización morfológica de los microorganismos aislados

La caracterización macroscópica de los microorganismos aislados de cada una de las colonias puras de cada medio se describió mediante taxonomía polifásica, utilizando la caracterización fenotípica y las características morfológicas macroscópicas de las colonias desarrolladas en las placas de agar bajo el estereoscopio, describiendo el tamaño, forma, bordes, elevación, superficie y textura, así como la velocidad de crecimiento. Además, se evaluó la capacidad de crecimiento de las bacterias, considerando de 1-3 días: rápido crecimiento y 4-6 o más: lento crecimiento (Llop *et al.*, 2001). La caracterización microscópica se realizó mediante la tinción de Gram (Claus, 1992).

2.5 Prueba de KOH

Esta prueba consistió en la toma de una asada de una colonia por cepa aislada, que fue mezclada en un portaobjetos con una gota de solución de KOH 3%. Esta prueba resultó positiva cuando se presentó la formación de un hilo al levantar el asa del portaobjetos.

2.6 Identificación molecular de los microorganismos aislados

La identificación de los aislados se realizó con base en la secuenciación parcial del gen 16S rRNA en el caso de las bacterias e ITS para levaduras. Los microorganismos se crecieron en medio BD King por 24 ó 72 h, dependiendo del crecimiento de cada cepa. El ADN total se extrajo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2% (CTAB) de acuerdo con Doyle y Doyle (1990). La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría mediante lecturas de absorbancia ($A_{280/260}$ y $A_{230/260}$) utilizando un Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, USA), y su integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, suplementado con 3 μ L de GelRed (Biotium, USA) y se visualizaron en un transiluminador UV 1000/26MXXpress (Vilber Lourmat, Germany) con el Software Biodoc analyze. La amplificación y secuenciación de gen 16S rRNA se llevó a cabo con los iniciadores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Eden *et al.*, 1991). En el caso de la región ITS se usó el primer ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATAT-GC) (White *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador C1000 (BIO-RAD, USA). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 15 μ L conteniendo 0.18 μ L de 5U Taq DNA polimerasa (Promega, Lyon, Francia), 3 μ L de 5X Green GoTaq[®] reacción Buffer (Promega, USA), 0.6 μ L de 2.5 mM dNTPs, 0.18 μ L de 10 pM por cada oligonucleótido, 7.86 μ L de H₂O HPLC y 3.0 μ L 20 ng DNA. El programa de amplificación consistió en un ciclo de 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos a 95 °C

por 2 min, 59 °C por 1 min, 72 °C por 1.5 min, y finalmente, una extensión por 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR de aproximadamente 250 pb, se limpiaron con EXOSAP-IT (Affymetrix, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados en la compañía MacroGen mediante pirosecuenciación. Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit versión v7.2.5 (Hall, 1999) para crear las secuencias consenso. Estas secuencias se analizaron con el Blastn algoritmo de BLAST/NCBI software (Altschul *et al.*, 1997) y Database Project release 11 (<http://rdp.cme.msu.edu/>). La reconstrucción filogenética de todas la secuencias se realizó con inferencia Bayesiana usando el programa Mr.Bayes v3.2.6 (Huelsenbeck y Ronquist 2001; Ronquist y Huelsenbeck 2003), se utilizó el modelo Generalized Time Reversible (GTR) con 5'000,000 de generaciones. Todas las secuencias fueron depositadas en el NCBI-GenBank. Para la construcción del árbol filogenético se consideró a la cepa NR_113432 *Halococcus hamelinensis* como fuera de grupo.

2.7 Determinación de la actividad enzimática de los microorganismos aislados

Para evaluar la actividad aminolítica, celulolítica, lipolítica, proteolítica, solubilización de fosfato y producción de ácidos orgánicos, los microorganismos se sembraron en los medios agar almidón, agar carboximetilcelulosa, Spirit blue, agar calcio caseinato, Pikovskaya y Pikovskaya modificado y respectivamente. Para revelar halos de hidrólisis de los microorganismos celulolíticos, se usó la técnica de rojo congo al 1% (p/v) según Teather y Wood (1982) y los amilolíticos por adición

de lugol (Pedroza *et al.*, 2007). En los medios restantes se observó la presencia de halos por el cambio del viraje.

RESULTADOS

3.1 Aislados obtenidos a partir de la microbiota interna y externa de *S. pectoralis* y *F. nigra*

En total se obtuvieron 147 aislados microbianos de *S. pectoralis* y *F. nigra* utilizando los diferentes medios y el protocolo de desinfección etanol al 96% e hipoclorito de sodio al 5% (2 min). En *F. nigra* se obtuvo el mayor número de aislados (n=79), el 51% se aisló de la microbiota externa (40 morfotipos) y el 49% de la microbiota interna (39 morfotipos). Contrario a estos resultados, en *S. pectoralis* (n=68) el 71% se aisló microbiota interna (48 morfotipos) y solo el 29% de la microbiota externa (20 morfotipos) (Figura 8).

Con respecto al medio utilizado para el aislamiento, se obtuvo un mayor número de morfotipos utilizando el medio LB en *S. pectoralis* (n=25) a partir de la microbiota interna. En el caso de *F. nigra*, el mayor número de aislados a partir de la microbiota interna, se encontró en el medio EM (n=17). En la microbiota externa, en la especie *S. pectoralis* obtuvo un mayor número de morfotipos utilizando el medio EM (n=9), por el contrario, en *F. nigra*, el medio LB demostró mayor número de morfotipos (n=15). El medio CZ demostró la menor cantidad de morfotipos aislados en ambas especies de ASA (Figura 8).

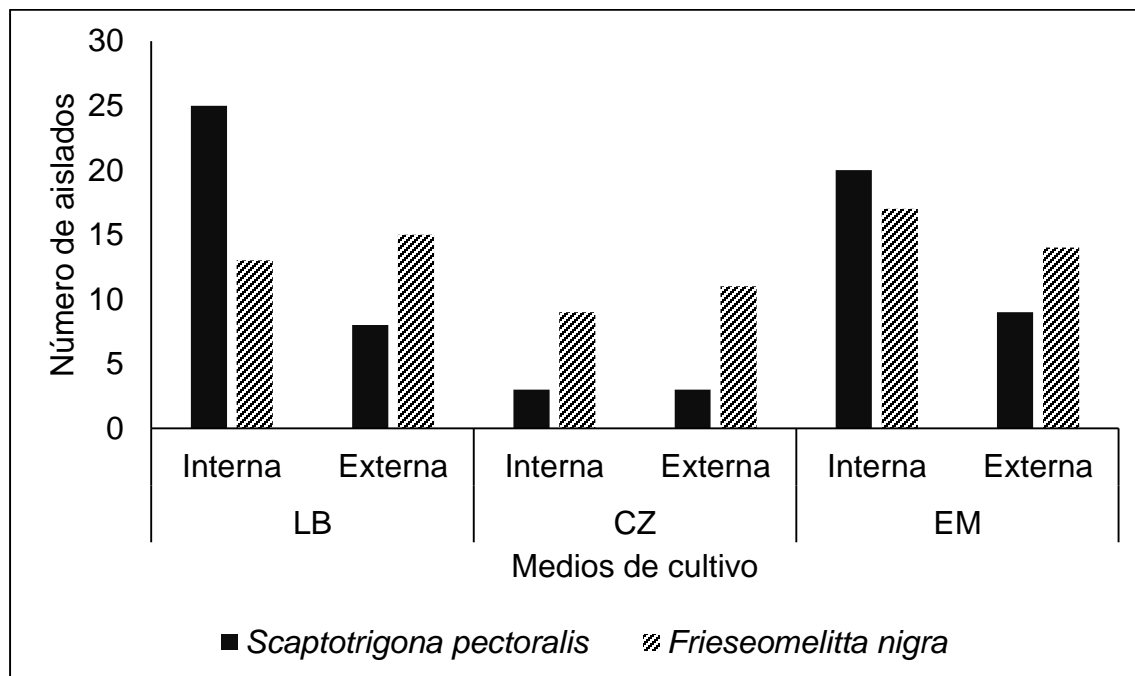


Figura 8. Números totales de morfotipos aislados de la microbiota interna y externa de las ASA *F. nigra* y *S. pectoralis* de la RBLP, cultivadas en los medios Luria Bertani=LB, Czapek Dox=CZ y Extracto de Malta=EM.

3.2 Caracterización micro y macroscópica de los aislados

Del total de 147 aislados, el 69% (102 aislados) perdió su viabilidad por lo que solo el 31% (45 aislados, 28 en *F. nigra* y 17 en *S. pectoralis*) del total aislado se sometió a la caracterización, identificación molecular y evaluación de su actividad. En cuanto a su caracterización microscópica, del total (45 aislados), se encontró un menor porcentaje (36%, 16 aislados) de gram negativas en relación con las gram positivas (64%, 29 aislados). El 49% demostró ser cocos y el 36% bacilos (Cuadro 10). En cuanto a la caracterización macroscópica de las colonias se encontraron diferentes formas desde circular, bordes enteros, ondulado hasta lobulado, con elevaciones planas, convexas y esta última con mayor frecuencia. Las coloraciones

de las colonias se observaron de color blanco a crema y muy pocas en color amarillo.

Asimismo, se realizó la prueba de KOH de las cepas (n=41) debido a que cuatro de ellas perdió su viabilidad. Como resultado de esta prueba se determinó que, 14 cepas demostraron resultados positivos y 27 de ellas mostró resultados negativos ante esta prueba.

Cuadro 10. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas de *F. nigra* y *S. pectoralis* de la RBLP.

ASA	Nido	Cepa	Microorganismo	Colonía							Refracción	Microscopía	Gram	KOH
				Origen	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Pigmento					
<i>F. nigra</i>	N13-24	CPO 4.227	<i>Bacillus cereus</i>	I	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Blanca	Brillante	Bacilos	+	-	
		CPO 4.232	<i>Bacillus cereus</i>	I	Circular	Ondulada	Plana	Lisa	Transparente	Brillante	Bacilos	+	-	
	N13-24	CPO 4.238	<i>Bacillus</i> sp.	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Brillante	Bacilos	+	-	
	N1-24	CPO 4.229	<i>Bacillus</i> sp.	E	Circular	Ondulado	Convexa	Lisa	Crema translúcida	Brillante	Bacilos	+	-	
		CPO 4.230	<i>Bacillus</i> sp.	E	Circular	Ondulada	Plana	Lisa	Crema translúcida	Opaco	Bacilos	+	-	
	N13-24	CPO 4.218	<i>Curtobacterium citreum</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema-Amarillo-Translúcido	Brillante	Bacilos	+	-	
	N13-24	CPO 4.220	<i>Ochrobactrum</i> sp.	E	Circular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Crema	Brillante	N.D.	-	+	
	N12-24	CPO 4.226	<i>Ochrobactrum</i> sp.	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco translúcido	Brillante	N.D.	-	+	
	N12-24	CPO 4.224	<i>Pantoea anthophila</i>	I	Circular	Lobulado	Plana	Lisa	Amarillo translúcido	Brillante	Bacilos	-	+	
		CPO 4.225	<i>Pantoea anthophila</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo transparente	Brillante	N.D.	-	N.D.	
	N13-24	CPO 4.234	<i>Pantoea anthophila</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo translúcido	Brillante	Cocos	-	+	
		CPO 4.235	<i>Pantoea anthophila</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo translúcido	Brillante	Cocos	-	+	
	N13-24	CPO 4.233	<i>Pseudomonas oryzae</i> habitans	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco translúcido	Brillante	Bacilos	-	+	
	N1-24	CPO 4.213	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	E	Circular	Ondulado	Convexa	Rugosa	Amarillo-crema	Poco brillante	Bacilos	-	+	
	N13-24	CPO 4.222	<i>Sinorhizobium</i> sp.	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	N.D.	-	+	
	N1-24	CPO 4.212	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Transparente	Brillante	Cocos	+	N.D.	
	N12-24	CPO 4.223	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema	Poco brillante	Cocos	+	-	
	N13-24	CPO 4.216	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcida	Brillante	Cocos	+	-	
		CPO 4.217	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Opaco	Cocos	+	-	

ASA	Nido	Cepa	Microorganismo	Colonia					Refracción	Microscopía	Gram	KOH	
				Origen	Forma	Borde	Elevación	Superficie					Pigmento
		CPO 4.236	<i>Staphylococcus aureus</i>	I	Circular	Sierra	Plana	Lisa	Blanca transparente	Opaca	Cocos	+	-
		CPO 4.237	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Plana	Lisa	Crema	Brillante	Cocos	+	-
	N1-24	CPO 4.214	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Blanco crema	Poco Brillante	Cocos	+	-
		CPO 4.215	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Plana	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Cocos	+	-
		CPO 4.228	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcida	Brillante	Cocos	+	N.D.
		CPO 4.231	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Cocos	+	-
	N13-24	CPO 4.219	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo	Brillante	Cocos	+	-
		CPO 4.221	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo	Poco brillante	Cocos	+	-
		CPO 4.239	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Plana	Lisa	Blanco	Brillante	Cocos	+	-
	N13	CPO 4.208	<i>Bacillus cereus</i>	I	Circular	Ondulado	Plana	Lisa	Crema	Opaco	Bacilos	+	-
	N13	CPO 4.240	<i>Candida metapsilosis</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Opaco	Levadura	+	-
	N15	CPO 4.243	<i>Candida metapsilosis</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Opaco	Levadura	+	-
	P1	CPO 4.242	<i>Candida metapsilosis</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Opaco	Levadura	+	-
	P1	CPO 4.200	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Bacilos	-	+
	P1	CPO 4.202	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Bacilos	-	+
	P1	CPO 4.204	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Bacilos	-	+
	N13	CPO 4.207	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Crema	Brillante	Bacilos	-	+
	P1	CPO 4.201	<i>Enterococcus</i> sp.	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema translúcido	Brillante	Cocos	+	-
	P1	CPO 4.203	<i>Klebsiella oxytoca</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema amarillento	Brillante	Bacilos	-	N.D.
	N15	CPO 4.243	<i>Candida metapsilosis</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Blanco	Poco brillante	Cocos	+	-

ASA	Nido	Cepa	Microorganismo	Colonia							Refracción	Microscopia	Gram	KOH
				Origen	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Pigmento					
	N15	CPO 4.210	<i>Pantoea anthrophila</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Amarillo translúcido	Brillante	Cocos	-	+	
	N13	CPO 4.206	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	I	Circular	Entero	Umbilicada	Lisa	Crema amarillento	Poco brillante	Bacilos	-	+	
	P1	CPO 4.241	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Café claro	Brillante	Cocos	+	-	
	N13	CPO 4.209	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Amarillo transparente	Brillante	Cocos	+	-	
	N15	CPO 4.211	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema	Brillante	Cocos	+	-	
	P1	CPO 4.205	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Crema	Brillante	Cocos	+	-	

I= microbiota interna, E= microbiota externa. *+: actividad positiva, -: actividad negativa

3.3 Identificación molecular de los microorganismos aislados

La identificación de los 45 microorganismos aislados a partir de ambas especies de ASA colectadas dentro de la RBLP (Cuadro 11). En la ASA *F. nigra*, se identificaron 28 cepas distribuidos en siete géneros tales como *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sinorhodobacter* y *Staphylococcus*. En la microbiota interna se identificaron 15 cepas y estas correspondieron a dos cepas de *B. cereus* (CPO 4.227 y CPO 4.232), una de *Bacillus* sp. (CPO 4.238), cuatro cepas de *Pantoea anthophila* (CPO 4.224, CPO 4.225, CPO 4.234 y CPO 4.235), una de *Pseudomona oryzihabitans* (CPO 4.233), una de *Curtobacterium citreum* (CPO 4.218) y seis cepas de *Staphylococcus cohnii* (CPO 4.212, CPO 4.223, CPO 4.216, CPO 4.217, CPO 4.236 y CPO 4.237). En la microbiota externa se identificaron 13 cepas y estas correspondieron a dos cepas de *Bacillus* sp. (CPO 4.229 y CPO 4.230), dos de *Ochrobactrum* sp. (CPO 4.220 y CPO 4.226), una de *P. stutzeri* (CPO 4.213), una de *Sinorhodobacter* sp. (CPO 4.222) y siete de *S. cohnii* (CPO 4.214, CPO 4.215, CPO 4.228, CPO 4.231, CPO 4.219, CPO 4.221 y CPO 4.239).

En la ASA *S. pectoralis*, se aislaron 14 cepas bacterianas distribuidas en seis diferentes géneros y estas correspondieron a *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Pantoea* y *Staphylococcus*. Asimismo, se aisló tres cepas de la levadura *Candida*. En la microbiota interna se identificaron en total 13 cepas bacterianas, una cepa de *B. cereus* (CPO 4.208), cinco cepas de *Enterobacter hormaechei* (CPO 4.200, CPO 4.202, CPO 4.204, CPO 4.207 y CPO 4.201), una cepa de *Klebsiella oxytoca* (CPO 4.203), una cepa de *Kocuria* sp. (CPO 4.244), una cepa de *P.*

anthophila (CPO 4.210), una cepa de *P. stutzeri* (CPO 4.206) y tres cepas de *S. cohnii* (CPO 4.241, CPO 4.209, CPO 4.211). También, se identificaron dos cepas de la levadura *C. metapsilosis* (CO 4.240, CPO 4.243). En la microbiota externa se identificó una cepa bacteria y esta correspondió al género *S. cohnii* (CPO 4.205). Asimismo, una cepa de la levadura *C. metapsilosis* (CPO 4.242).

Cuadro 11. Cepas de microorganismos identificados de *F. nigra* y *S. pectoralis* de la RBLP, Campeche.

ASA	Nido	Cepa	Microorganismo	Origen	Número de accesión Gen Bank NCBI
<i>F. nigra</i>	N13-24	CPO 4.208	<i>Bacillus cereus</i>	I	MN733036
		CPO 4.227	<i>Bacillus cereus</i>	I	MN733055
	N13-24	CPO 4.232	<i>Bacillus cereus</i>	I	MN733066
	N1-24	CPO 4.238	<i>Bacillus</i> sp.	E	MN733057
		CPO 4.229	<i>Bacillus</i> sp.	E	MN733058
	N13-24	CPO 4.230	<i>Bacillus</i> sp.	I	MN733046
	N13-24	CPO 4.218	<i>Curtobacterium citreum</i>	E	MN733048
	N12-24	CPO 4.220	<i>Ochrobactrum</i> sp.	E	MN733054
	N12-24	CPO 4.226	<i>Ochrobactrum</i> sp.	I	MN733052
		CPO 4.224	<i>Pantoea anthophila</i>	I	MN733053
	N13-24	CPO 4.225	<i>Pantoea anthophila</i>	I	MN733062
		CPO 4.234	<i>Pantoea anthophila</i>	I	MN733063
	N13-24	CPO 4.235	<i>Pantoea anthophila</i>	I	MN733061
	N1-24	CPO 4.233	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	E	MN733041
	N13-24	CPO 4.213	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	E	MN733050
	N1-24	CPO 4.222	<i>Sinorhodobacter</i> sp.	I	MN733040
	N12-24	CPO 4.212	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733051
	N13-24	CPO 4.223	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733044
		CPO 4.216	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733045
		CPO 4.217	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733064
CPO 4.236		<i>Staphylococcus aureus</i>	I	MN733065	

ASA	Nido	Cepa	Microorganismo	Origen	Número de accesión Gen Bank NCBI
	N1-24	CPO 4.237	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733042
		CPO 4.214	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733043
		CPO 4.215	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733056
		CPO 4.228	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733059
	N13-24	CPO 4.231	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733047
		CPO 4.219	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733049
		CPO 4.221	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733067
<i>S. pectoralis</i>	N13	CPO 4.239	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733060
	N13	CPO 4.208	<i>Bacillus cereus</i>	I	MN733070
	N15	CPO 4.240	<i>Candida metapsilosis</i>	I	MN733072
	P1	CPO 4.243	<i>Candida metapsilosis</i>	E	MN733071
	P1	CPO 4.242	<i>Candida metapsilosis</i>	I	MN733028
	P1	CPO 4.200	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	MN733030
	P1	CPO 4.202	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	MN733032
	N13	CPO 4.204	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	MN733035
	P1	CPO 4.207	<i>Enterobacter hormaechei</i>	I	MN733029
	P1	CPO 4.201	<i>Enterococcus</i> sp.	I	MN733031
	N15	CPO 4.203	<i>Klebsiella oxytoca</i>	I	MN733069
	N15	CPO 4.243	<i>Candida metapsilosis</i>	I	MN733038
	N13	CPO 4.210	<i>Pantoea anthophila</i>	I	MN733034
	P1	CPO 4.206	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	I	MN733068
	N13	CPO 4.241	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733037
	N15	CPO 4.209	<i>Staphylococcus cohnii</i>	I	MN733039
	P1	CPO 4.211	<i>Staphylococcus cohnii</i>	E	MN733033
		CPO 4.205	<i>Staphylococcus cohnii</i>		

I= microbiota interna, E= microbiota externa. * +: actividad positiva, -: actividad negativa

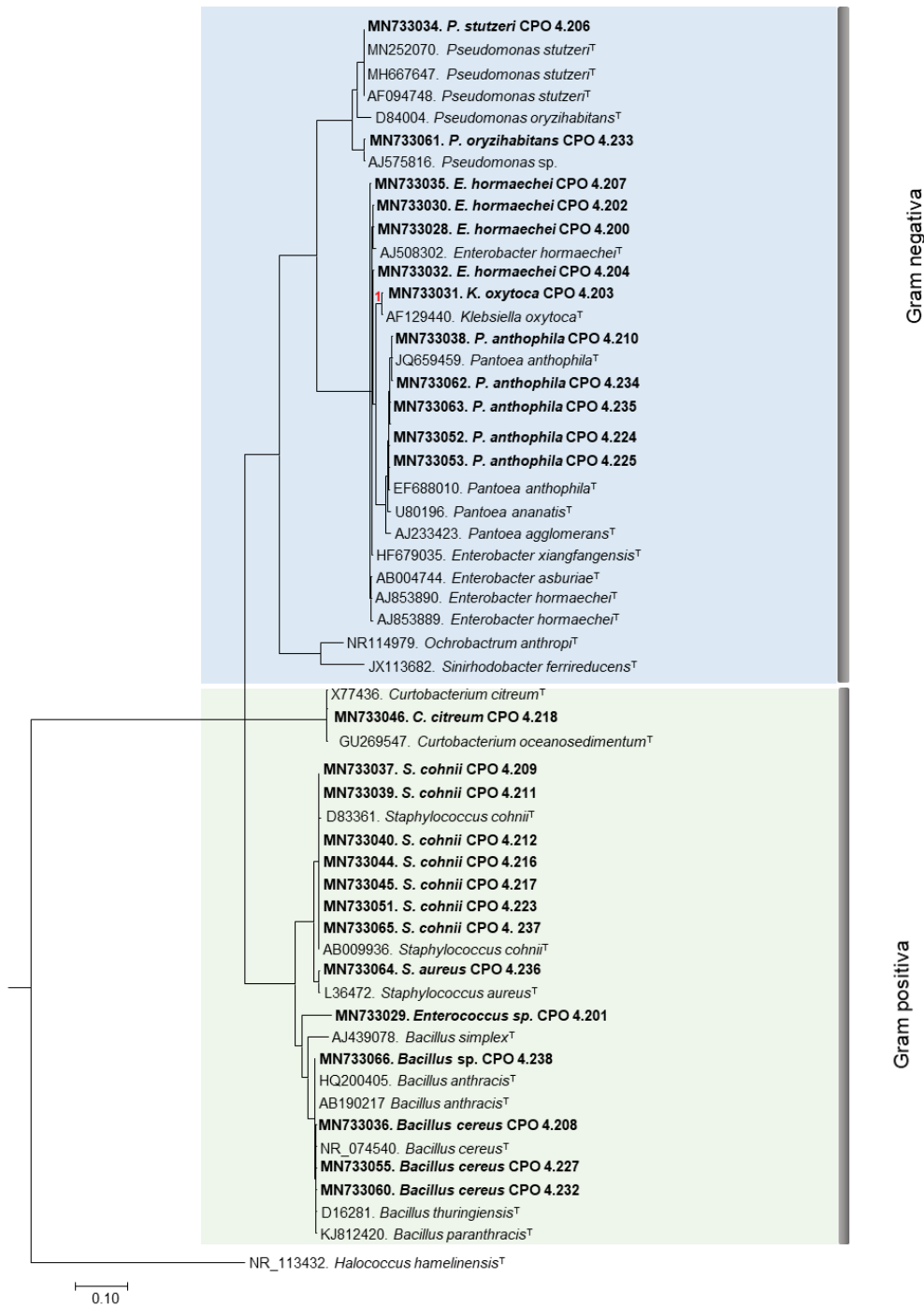


Figura 9. Árbol filogenético de la identificación de los aislamientos de la microbiota interna

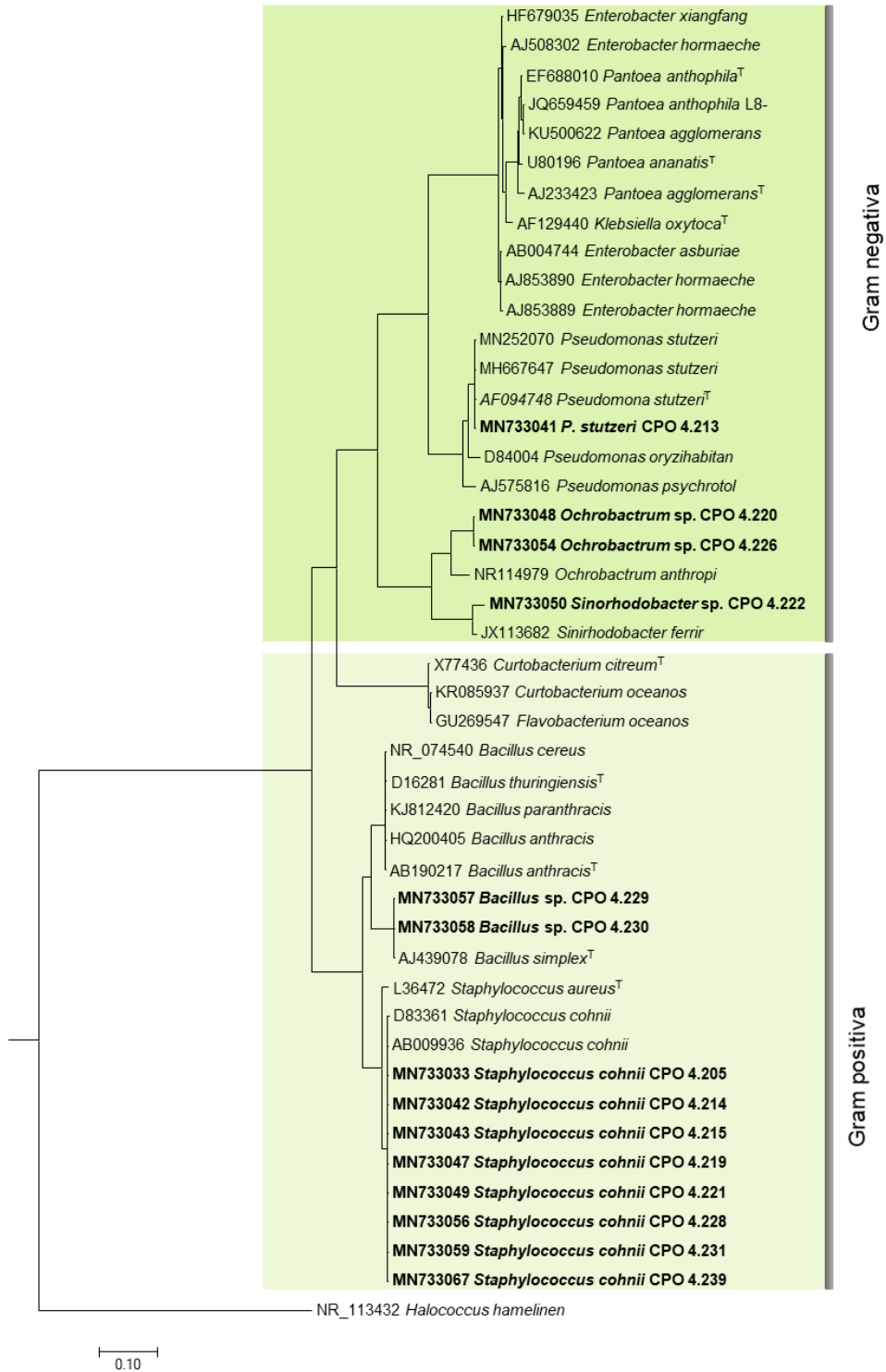


Figura 10. Árbol filogenético de los aislamientos identificados de la microbiota externa.

3.4 Prospección de la actividad funcional de los microorganismos aislados

Un total de 41 de cepas fueron evaluados en cuanto a su actividad amilolítica, celulolítica, lipolítica, proteolítica, solubilización de fosfato y producción de ácidos orgánicos, debido a que 4 de las 45 cepas de microorganismos identificados molecularmente perdieron su viabilidad (Cuadro 12). Todas las cepas presentan una o múltiples actividades, sin embargo, ninguna cepa sometida presentó todas las actividades evaluadas.

En cuanto a la actividad amilolítica, solo el 20% de las cepas mostró esta actividad (n=9), las cepas con mayor actividad correspondieron a *B. cereus* CPO 4.227, CPO 4.208 y *P. stutzeri* CPO 4.206C, y con menor actividad se encontró a las cepas *P. stutzeri* CPO 4.213, *Sinorhodobacter* sp. CPO 4.222, *Staphylococcus cohnii* CPO 4.237, *Candida metapsilosis* CPO 4.243, *Candida metapsilosis* CPO 4.243 y *Pantoea anthophila* CPO 4.210. La actividad celulolítica se observó en el 9% de las cepas identificadas (n=3). La cepa con mayor actividad correspondió a *Pseudomona oryzihabitans* CPO 4.233 y con una menor actividad se encontró a las cepas *Bacillus cereus* CPO 4.227, CPO 4.208 y *Pantoea anthophila* CPO 4.235.

El 47% de las cepas presento la actividad lipolítica (n=21), por lo que fue la actividad con mayor número cepas con esta propiedad. Las cepas con mayor actividad correspondieron *Pantoea anthophila* CPO 4.224, *Enterobacter hormaechei* CPO 4.202 y *Pseudomonas stutzeri* CPO 4.206. Con menor actividad se encontraron a las cepas *Bacillus cereus* CPO 4.227, CPO 4.232, CPO 4.208, *Bacillus* sp. CPO 4.238, CPO 4.229, CPO 4.230, *Pantoea anthophila* CPO 4.235,

CPO 4.210, *Pseudomona oryzihabitans* CPO 4.233, *Pseudomonas stutzeri* CPO 4.213, *Staphylococcus cohnii* CPO 4.223, CPO 4.231, CPO 4.219, CPO 4.221, *Enterobacter hormaechei* CPO 4.200, CPO 4.204, CPO 4.207 y *Candida metapsilosis* CPO 4.243. El 24% de las cepas evaluadas presento actividad proteolítica, la cepa con mayor actividad correspondió *Pantoea anthophila* CPO 4.224 y con menor actividad se encontró a las cepas *Bacillus cereus* CPO 4.227, CPO 4.232, CPO 4.208, *Bacillus* sp. CPO 4.230, *Ochrobactrum* sp.CPO 4.220, *Pantoea anthophila* CPO 4.234, *Pseudomonas stutzeri* CPO 4.213, *Staphylococcus cohnii* CPO 4.231, CPO 4.219 y CPO 4.241 (Cuadro 12).

La segunda actividad con mayor número de cepas correspondió a la actividad solubilizadora de fosfato con un 44% (n=20). Las cepas con mayor actividad correspondieron a *Bacillus* sp. CPO 4.238, *Ochrobactrum* sp.CPO 4.220, *Pantoea anthophila* CPO 4.224, *Enterobacter hormaechei* CPO 4.202, CPO 4.204 y *Staphylococcus cohnii* CPO 4.241. Las cepas con menor actividad correspondieron a *Curtobacterium citreum* CPO 4.218, *Ochrobactrum* sp.CPO 4.226, *Pantoea anthophila* CPO 4.234, CPO 4.235, CPO 4.210, *Pseudomona oryzihabitans* CPO 4.233, *Pseudomonas stutzeri* CPO 4.213, *Sinorhodobacter* sp.CPO 4.222, *Staphylococcus cohnii* CPO 4.219, *Candida metapsilosis* CPO 4.240, CPO 4.243, CPO 4.242, *Enterobacter hormaechei* CPO 4.200, CPO 4.207 (Cuadro 13).

La producción de ácidos orgánicos se presentó en 29% de las cepas evaluadas, la cepa con mayor actividad correspondió a *Sinorhodobacter* sp. CPO 4.222, y con menor actividad se encontraron a las cepas *Bacillus* sp. CPO 4.238, *Ochrobactrum* sp. CPO 4.226, *Pantoea anthophila* CPO 4.235, CPO 4.210, *Candida metapsilosis*

CPO 4.240, CPO 4.243, CPO 4.242, *Enterobacter hormaechei* CPO 4.200, CPO 4.202, CPO 4.204, CPO 4.207 y *Pseudomonas stutzeri* CPO 4.206 (Cuadro 13).

Cuadro 12. Evaluación de las actividades bioquímicas de 41 cepas aisladas de *F. nigra* y *S. pectoralis* de la RBLP, Campeche.

ASA	Nido	Microorganismo identificado	Origen	Amitolítica	Celulolítica	Lipolítica	Proteolítica	Solubilización de fosfato	Ácido orgánico
<i>F. nigra</i>	N13-24	<i>Bacillus cereus</i> CPO 4.227	I	++	+	+	+		
		<i>Bacillus cereus</i> CPO 4.232	I		+	+	+		
	N13-24	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.238	I		+	+		++	+
	N1-24	<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.229	E		+				
		<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.230	E		+		+		
	N13-24	<i>Curtobacterium citreum</i> CPO 4.218	I					+	
	N13-24	<i>Ochrobactrum</i> sp. CPO 4.220	E				+	++	
	N12-24	<i>Ochrobactrum</i> sp. CPO 4.226	E					+	+
	N12-24	<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.224	I		++	++	++	++	
		<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.225	I						
	N13-24	<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.234	I				+	+	
		<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.235	I		+	+		+	+
	N13-24	<i>Pseudomonas oryzae</i> CPO 4.233	I		++	++		+	
	N1-24	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CPO 4.213	E	+		+	+	+	
	N13-24	<i>Sinorhizobium</i> sp. CPO 4.222	E	+				+	++
	N1-24	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.212	I						
	N12-24	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.223	I				+		
	N13-24	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.216	I						
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.217	I						
		<i>Staphylococcus aureus</i> CPO 4.236	I						
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.237	I				+		
	N1-24	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.214	E						
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.215	E						

ASA	Nido	Microorganismo identificado	Origen	Amilolítica	Celulolítica	Lipolítica	Proteolítica	Solubilización de fosfato	Ácido orgánico
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.228	E						
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.231	E			+	+		
	N13-24	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.219	E			+	+	+	
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.221	E			+			
		<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.239	E						
<i>S. pectoralis</i>	N13	<i>Bacillus cereus</i> CPO 4.208	I	++	+		+		
	N13	<i>Candida metapsilosis</i> CPO 4.240	I					+	+
	N15	<i>Candida metapsilosis</i> CPO 4.243	I	+				+	+
	P1	<i>Candida metapsilosis</i> CPO 4.242	E					+	+
	P1	<i>Enterobacter hormaechei</i> CPO 4.200	I			+		+	+
	P1	<i>Enterobacter hormaechei</i> CPO 4.202	I			++		++	+
	P1	<i>Enterobacter hormaechei</i> CPO 4.204	I			+		++	+
	N13	<i>Enterobacter hormaechei</i> CPO 4.207	I			+		+	+
	P1	<i>Enterococcus</i> sp. CPO 4.201	I						
	P1	<i>Klebsiella oxytoca</i> CPO 4.203	I						
	N15	<i>Candida metapsilosis</i> CPO 4.243	I	+		+			
	N15	<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.210	I	+		+		+	+
	N13	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CPO 4.206	I	++		++			+
	P1	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.241	I				+	++	
	N13	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.209	I						++
	N15	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.211	I						
	P1	<i>Staphylococcus cohnii</i> CPO 4.205	E						

I= microbiota interna, E= microbiota externa. *+: actividad positiva, -: actividad negativa

DISCUSIÓN

Los insectos participan en una gran variedad de interacciones simbióticas con microorganismos que van desde relaciones de parasitismo hasta mutualistas. En esta última interacción, los simbiosiontes proporcionan a sus anfitriones nutrientes o defensa contra patógenos, parásitos o depredadores, a través de múltiples mecanismos como la producción de compuestos antimicrobianos o toxinas. Mientras que en el mutualismo nutricional pueden proporcionar nutrientes como aminoácidos, vitaminas o enzimas digestivas que ayudan en la degradación de polímeros o compuestos tóxicos (Berasategui *et al.*, 2016; Douglas, 2009; Douglas, 2015). Por lo tanto, las interacciones mutualistas juegan un papel importante en los insectos permitiéndoles explotar ecológicamente nichos que de otro modo habrían permanecido inaccesibles (Sudakaran *et al.*, 2015). El éxito evolutivo de los insectos es altamente atribuible a sus relaciones con las comunidades microbianas o microflora intestinal, ya que contribuyen de manera crítica en la digestión de los componentes alimenticios (Pal y Karmakar, 2018).

Actualmente, debido a la disminución global de las poblaciones de las abejas, es de gran interés estudiar la microbiota de las abejas para entender sus funciones y plantear estrategias que permitan su conservación. Por tal razón, las investigaciones sobre la microbiota aumentan constantemente, principalmente en aspectos sobre la diversidad, dinámica temporal y la salud de las abejas. Sin embargo, solo unos pocos estudios han tratado la microbiota natural de las abejas y gran parte de los estudios se enfocan en la abeja *A. mellífera* y abejorros (Engel *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2018).

En este trabajo, se realizó el aislamiento de la microbiota interna y externa en las ASA *S. pectoralis* y *F. nigra* en su hábitat natural en la RLBP. Este estudio se observó un mayor número de cepas bacterianas en *F. nigra* (n=28) en comparación con *S. pectoralis* (n=14). En total en ambas ASA se identificaron cepas bacterianas pertenecientes a 10 géneros diferentes como *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sinorhodobacter* y *Staphylococcus*. En la microbiota interna de *F. nigra* se identificaron a *B. cereus*, *Bacillus* sp., *P. anthophila*, *P. oryzihabitans*, *C. citreum* y *S. cohnii*. En la microbiota externa se identificó a *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp. *Sinorhodobacter* sp. y *S. cohnii*. Mientras que la ASA *S. pectoralis* en la microbiota interna se identificó a *B. cereus*, *E. hormaechei*, *K. oxytoca*, *Kocuria* sp., *P. anthophila*, *P. stutzeri* y *S. cohnii*; y en la microbiota externa solo se identificó a *S. cohnii*. Estos resultados permiten observar que las especies *B. cereus*, *P. anthophila*, *P. stutzeri* y *S. cohnii* fueron identificadas en ambas especies ASA. Por el contrario, las cepas *C. metapsilosis*, *E. hormaechei*, *K. oxytoca* y *Kocuria* sp son exclusivas de *S. pectoralis* y las especies *Bacillus* sp., *C. citreum*, *Ochrobactrum* sp., *P. oryzihabitans* y *Sinorhodobacter* sp., se identificaron como exclusivas de la especie de *F. nigra*. En este estudio no se logró identificar una gran variedad de microorganismos ya que un gran parte de ellos perdió su viabilidad. Esto puede deberse a la naturaleza del origen de los mismos ya que pueden ser simbiontes obligados con exigencias ambientales y nutricionales específicas. Loncaric *et al.*, (2009) reportó una pérdida de viabilidad de cepas bacterianas después de 48 h de

incubación a temperaturas mayores a los 24 °C, lo que podría dificultar el cultivo del microbioma de las ASA.

A diferencia de otros estudios en los que se encuentran una gran cantidad de cepas correspondientes a especies de *Bacillus*, en nuestro estudio *Staphylococcus* fue el género encontrado con mayor frecuencia en ambas especies de ASA. Previamente, existen reportes de la presencia de este mismo género en la miel y polen de la ASA *Trigona carbonaria*. Por su parte, Anjum *et al.*, (2018) reportaron un mayor porcentaje de este mismo género bacteriano en la flora del intestino de *A. mellifera*. Las abejas son insectos sociales que recorren grandes distancias para recolectar néctar y polen, por lo tanto, su contacto con diversos entornos actúa como un vector de flora bacteriana diversa. Varias bacterias patógenas oportunistas ya han sido reportadas en diferentes insectos incluyendo insectos fitófagos asociados a plantas (Soto-Arias *et al.*, 2014). Por lo tanto, el néctar es considerado como un reservorio bacteriano ambiental (Anjum *et al.*, 2018). Asimismo, se han reportado más de cincuenta especies de bacterias de 31 géneros asociadas con diferentes hormigas, incluidas *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomona*, *Bacillus*, *Klebsiella* (Pesquero *et al.*, 2012) géneros encontrados en este trabajo.

El género *Bacillus* es considerado como una de las bacterias más benéficas en las abejas (Anjum *et al.*, 2018; Leonhardt y Kaltenpoth, 2014; Ngalimat *et al.*, 2019; Pucciarelli *et al.*, 2014).). En este trabajo se encontraron cepas de este género en *F. nigra* y *S. pectoralis*. Entre los bacilos identificadas se encuentra *Bacillus* sp y *B. cereus*, las cuales presentaron múltiples actividades, como aminolíticas, celulolíticas, lipolíticas, proteolíticas, solubilización de fósforo y ácidos orgánicos, lo

que confirma la asociación simbiótica de este género en estas dos especies de ASA. Recientemente, Ngalimat, *et al.* (2019) reportaron que las especies de *Bacillus stratosphericus* PD6, *B. amyloliquefaciens* PD9, *B. subtilis* BD3 y *B. safensis* BD9 aisladas a partir de los nidos, miel, pan de abeja y el propóleo de *H. itama* las cuales presentan actividades proteolíticas, lipolíticas y celulolíticas y son capaces de utilizar carbohidratos, así como aminoácidos y ácidos carboxílicos. En los ensayos para determinar la actividad de los microorganismos en este trabajo se observó que la actividad lipolítica fue la que presentó la mayoría de los aislamientos, seguido por la actividad solubilizadora de fosfato y producción de ácidos orgánicos. Las bacterias aisladas podrían estar participando en la producción de enzimas que favorezcan su nutrición y establecimiento. Por ejemplo, se ha reportado que la miel y el pan de abejas contiene múltiples ácidos orgánicos no aromáticos, incluidos el ácido málico, cítrico, láctico, succínico y fumárico (Sancho *et al.*, 2013; Kiesliszek *et al.*, 2018), que podrían ser proporcionados por estos microorganismos al presentar dicha actividad. Asimismo, los productos generados en el nido a partir de materiales de origen vegetal como biomoléculas complejas, celulosa, proteínas y lípidos requieren de enzimas hidrolíticas para su degradación o formación (Gilliam, Roubik y Lorenz, 1990; Vásquez y Olofsson, 2009; Lee *et al.*, 2015), los microorganismos podrían estar desempeñando un papel importante en la producción de estas enzimas. Por lo tanto, la digestión de sus alimentos o formación de materiales para el nido en estas ASA podría ser proporcionado por estos microorganismos.

Por otro lado, se ha visto que las levaduras participan en múltiples procesos fermentativos (Rosa *et al.* 2005; Teixeira *et al.*, 2003), en la ASA *S. pectoralis* se

identificó tanto de la microbiota externa como interna a la levadura *C. metapsilosis*. Esta levadura previamente ha sido reportada en la miel de la abeja *Apis florea* y la ASA *Tetragonula pagden* (Saksinchai *et al.*, 2012). Asimismo, se ha reportado otras levaduras en otras especies de ASA, por ejemplo, *Starmerella melliponinorum* la cual se ha aislado de varios sustratos. Rosa *et al.* (2003) y Teixeira *et al.* (2003) reportaron el aislamiento de la levadura de *S. melliponinorum* en polen, abejas adultas, miel y propóleo de *Tetragononisca angustula*, *Melipona rufiventris* y *Trigona fulviventris*. La ASA *T. angustula* ha demostrado una fuerte asociación con *S. melliponinorum* y *Zygosaccharomyces machadoi* (Rosa y Lachance, 2005). Además, Rosa *et al.*, (2003) identificaron un complejo de *Candida apícola* en nidos de *Melipona quadrifasciata*. Rosa *et al.* (2007) reportaron la presencia de *Candida floris* en insectos adultos de la ASA *Trigona* sp. Más recientemente, Saksinchai *et al.* (2012) reportaron la identificación de *Candida* sp. *C. apícola*, *C. etchellsii*, *C. metapsilosis*, *Starmerella* sp. en *Tetragonilla collina*, *Tetragonula laeviceps*, *T. pagdeni* y *Trigona* sp. Las levaduras presentes *S. pectoralis* podrían estar participando en la fermentación de miel y otros sub-productos del nido.

Otro género identificado en este estudio en ambas especies de ASA es *Pantoea*. La especie *Pantoea anthophila* presento importante actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato. Este género se ha encontrado en el intestino de otras abejas melíferas (Loncaric *et al.*, 2009; Lyapunov *et al.*, 2008). Asimismo, se cree que la fuente principal de este microorganismo son las plantas, puesto que este se ha aislado a partir de las raíces, hojas y flores de plantas (Junker *et al.*, 2011). Razón por la cual las cepas aisladas en nuestro estudio poseen la capacidad de solubilizar

fosfato. De igual forma, estos mismos autores aislaron a *Curtobacterium* a partir de hojas de plantas, por lo que posiblemente este género aislado exclusivamente en *F. nigra* proviene de la flora visitada por las obreras.

CONCLUSIÓN

El análisis del microbioma de las ASA *S. pectoralis* y *F. nigra* permitió identificar 10 géneros diferentes conocidos *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sinorhodobacter* y *Staphylococcus*. Asimismo, se aisló cuatro cepas de la levadura *C. metapsilosis* a partir de la microbiota interna y externa de *S. pectoralis*. Se encontraron cepas de *Bacillus* con importantes actividades aminolíticas, celulolíticas, lipolíticas, proteolíticas, solubilización de fósforo y ácidos orgánicos. La actividad lipolítica fue la actividad con mayor número de bacterias, seguido por la actividad solubilizadora de fosfato y producción de ácidos orgánicos. La especie *P. anthophila* presento importante actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato. Estos resultados indican que los microorganismos podrían estar desempeñando un papel importante en la producción de enzimas que favorezcan la digestión de sus alimentos o formación de materiales para el nido.

LITERATURA CITADA

Aguilar, I., Herrera, E., y Zamora, G. (2013). Stingless bees of Costa Rica. In Pot-Honey (pp. 113-124). Springer, New York, NY.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3404.

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Eckholm, B. J., Mott, B. M., & De Grandi-Hoffman, G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honeybee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58(4), 431.

Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., y Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honeybees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 8(12), e83125.

Anjum, S. I., Shah, A. H., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim, M. K., Ansari, M. J. y Bin, L. (2018). Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi journal of biological sciences*, 25(2), 388--392.

Ayala, R., Gonzalez, V. H., y Engel, M. S. (2013). Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution, and indigenous knowledge. In Pot-Honey (pp. 135-152). Springer, New York, NY.

Barbosa, R. N., Bezerra, J. D., Souza-Motta, C. M., Frisvad, J. C., Samson, R. A., Oliveira, N. T., y Houbraken, J. (2018). New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(10), 1883-1912.

Barbosa, R. N., Leong, S. L., Vinnere-Pettersson, O., Chen, A. J., Souza-Motta, C. M., Frisvad, J. C., y Houbraken, J. (2017). Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. *Studies in mycology*, 86, 29-51.

Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., y Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(4), 1567-1577.

Bonilla-Rosso G, Engel P. Functional roles and metabolic niches in the honeybee gut microbiota. *Current Opinion Microbiology* 2018 Jun. 43:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.009> PMID: 29309997.

Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman, R. M., & Handelsman, J. (2004). Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(1), 293-300.

Brown JC, Oliveira ML (2014) The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. *Apidologie* 42:172–188

Claus, D. (1992). A standardized Gram staining procedure. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 451-452.

Dantur, K. I., Enrique, R., Welin, B., & Castagnaro, A. P. (2015). Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5(1), 15.

Davidson, E. W., Segura, B. J., Steele, T., & Hendrix, D. L. (1994). Microorganisms influence the composition of honeydew produced by the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Insect Physiology*, 40(12), 1069-1076.

de Almeida, L. G., de Moraes, L. A. B., Trigo, J. R., Omoto, C., & Cônsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PloS one*, 12(3), e0174754.

del Risco-Ríos, C. A., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V. P., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y., y García-Neninger, R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43(1), 17-21.

Douglas AE (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct Ecol* 23:38–47. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x

Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, 60, 17-34.

Douglas, A.E. The molecular basis of bacterial–insect symbiosis. *J. Mol. Biol.* 2014, 426, 3830–3837.

Doyle JJ, Doyle JL, 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.

Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR, 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol* 41: 324-325.

Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A. y Emery, O. (2016). The bee microbiome: impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *MBio*, 7(2), e02164-15.

Feldhaar H, Gross R (2009) Genome degeneration affects both extracellular and intracellular bacterial endosymbionts. *J Biol* 8: 31.

Fernandes-da-Silva, P. G., & Serrão, J. E. (2000). Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, 31(1), 39-45.

Gandotra, S., Bhuyan, P. M., Gogoi, D. K., Kumar, A., & Subramanian, S. (2018). Screening of Nutritionally Important Gut Bacteria from the Lepidopteran Insects Through Qualitative Enzyme Assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(1), 329-337.

Gilliam M, Roubik DW, Lorenz BJ. 1990. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie* 21(2):89–97 DOI 10.1051/apido:19900201.

Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Junker, R. R., Loewel, C., Gross, R., Dötterl, S., Keller, A., y Blüthgen, N. (2011). Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biology*, 13(6), 918-924.

Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażejczak S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. 2018. Pollen and bee bread as new health-oriented products: a review. *Trends in Food Science y Technology* 71:170–180 DOI 10.1016/j.tifs.2017.10.021.

Koch, H., Abrol, D. P., Li, J., y Schmid-Hempel, P. (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, 22(7), 2028-2044.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35: 1547-1549.

Kwong WK, Moran NA. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* 14:374–384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43

Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., y Newton, I. L. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental microbiology*, 17(3), 796-815.

Leonhardt, S. D., y Kaltenpoth, M. (2014). Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PLoS One*, 9(8), e105718.

Llop Hernández, A., Valdés-Dapena Vivanco, M. M., & Zuazo Silva, J. L. (2001). *Microbiología y Parasitología Médicas*. Tomo I.

Loncaric, I., Heigl, H., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H. J., y Rosengarten, R. (2009). Typing of *Pantoea agglomerans* isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey. *Apidologie*, 40(1), 40-54.

Lyapunov, Y. E., Kuzyaev, R. Z., Khismatullin, R. G., & Bezgodova, O. A. (2008). Intestinal enterobacteria of the hibernating *Apis mellifera mellifera* L. bees. *Microbiology*, 77(3), 373.

Menezes, C., Vollet-Neto, A., Marsaioli, A. J., Zampieri, D., Fontoura, I. C., Luchessi, A. D., y Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, 25(21), 2851-2855.

Michener CD. 2007. *The bees of the world*, second edition. Johns Hopkins University Press; Baltimore, USA. 953 pp.

Newton, I.L.G., Sheehan, K., Lee, F.J., Horton, M.A., and Hicks, R.D. (2013) Invertebrate systems for hypothesisdriven microbiome research. *Microbiome Sci Med* 1: 1–9.

Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., y Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. PeerJ, 7, e7478.

Olofsson TC, Vásquez A (2008) Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. Current microbiology 57: 356–363. 17.

Olofsson TC, Vásquez A, Sammataro D, Macharia J (2011) A scientific note on the lactic acid bacterial flora within the honeybee subspecies; *Apis mellifera* (Buckfast), *A. m. scutellata*, *A. m. mellifera*, and *A. m. monticola*. Apidologie. pp 1–4. 18.

Pal, S., y Karmakar, P. (2018). Symbionts associated with insect digestive system and their role in insect nutrition. J. Entomol. Zool. Stud, 6, 421-425.

Paludo, C. R., Menezes, C., Silva-Junior, E. A., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., Pishchany, G., y Clardy, J. (2018). Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. Scientific reports, 8(1), 1122.

Paludo, C. R., Pishchany, G., Andrade-Dominguez, A., Silva-Junior, E. A., Menezes, C., Nascimento, F. S., ... y Pupo, M. T. (2019). Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. PloS one, 14(7).

Pedroza, A., Matiz, A., Quevedo, B., y Aguirre, A. (2007). Manual de introducción a la biotecnología.

Pesquero, M.A., Carneiro, L.C., Pires, D.D.J., 2012. Insect/bacteria association and nosocomial infection, In: Kumar, Y. (Ed.), *Salmonella*, A Diversified Superbug, pp 449–468.

Piccini C, Antunez K, Zunino P (2004) An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. *J Apic Res* 43:101–104

Potts, S. G. *et al.* Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353 (2010).

Pucciarelli AB, Schapovaloff ME, Kummritz S, Seňuk IA, Brumovsky LA, Dallagnol AM. 2014. Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología* 46(4):325–332 DOI 10.1016/S0325-7541(14)70091-4.

Raymann K, Shaffer Z y Moran NA Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol* 15, e2001861 (2017). [PubMed: 28291793]

Raymann, K., y Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, 26, 97-104.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Rooks MG y Garrett WS Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol* 16, 341–352 (2016). [PubMed: 27231050]

Rosa CA, Lachance MA (2005) *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Lundiana* 6:27–29

Rosa CA, Pagnocca FC, Lachance MA, Ruivo CCC, Medeiros AO, Pimentel MRC, Fontenelle JCR, Martins RP (2007) *Candida flosculorum* sp. nov. and *Candida floris* sp. nov., two yeast species associated with tropical flowers. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2970–2974. doi:10.1099/ijs.0.65230-0

Rosa, C. A., Lachance, M. A., Silva, J. O., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Antonini, Y., y Martins, R. P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS yeast research*, 4(3), 271-27

Sachs JL, Essenberg CJ, Turcotte MM. (2011). New paradigms for the evolution of beneficial infections.

Saksinchai, S., Suzuki, M., Chantawannakul, P., Ohkuma, M., y Lumyong, S. (2012). A novel ascosporeogenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. *Fungal Diversity*, 52(1), 123-139.

Sancho MT, Mato I, Huidobro JF, Fernández-Muiño MA, Pascual-Maté A. (2013). Nonaromatic organic acids of honeys. In: Patricia V, Silvia RMP, David R, eds. *Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees*. New York: Springer, 447–458.

Santos Gai, C., Dini-Andreote, F., Dini Andreote, F., Spotti Lopes, J. R., Araújo, L., Miller, A., y Alfenas, M. G. (2010). Endophytic Bacteria Associated to *Sharpshooters* (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Journal of Plant Pathology & Microbiology.

Soto-Arias, J. P., Groves, R. L., y Barak, J. D. (2014). Transmission and retention of *Salmonella enterica* by phytophagous hemipteran insects. Appl. Environ. Microbiol., 80(17), 5447-5456.

Sudakaran S, Retz F, Kikuchi Y, Kost C, Kaltenpoth M (2015) Evolutionary transition in symbiotic syndromes enabled diversification of phytophagous insects on an imbalanced diet. ISME J 9: 2587–2604. doi:10.1038/ismej.2015.75

Teather, R., y P, W. (1982). Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Applied Environmental Microbiology, 43, 777-780.

Teixeira, A. C., Marini, M. M., Nicoli, J. R., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., y Rosa, C. A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel *ascomycetous* yeast species associated with stingless bees. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(1), 339-343.

Thomas, G.H., Zucker, J., Macdonald, S.J., Sorokin, A., Goryanin, I., and Douglas, A.E. (2009) A fragile metabolic Trends in Ecology and Evolution 26:202–209.

Vásquez A, Olofsson TC, Sammataro D (2009) A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA A comparison with bees from Sweden. *Apidologie* 40: 26–28.

Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., y Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PloS one*, 7(3), e33188.

Villegas-Plazas, M., Figueroa-Ramírez, J., Portillo, C., Monserrate, P., Tibatá, V., Sánchez, O. A., y Junca, H. (2018). Yeast and Bacterial Composition in Pot-Pollen Recovered from Meliponini in Colombia: Prospects for a Promising Biological Resource. In *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 263-279). Springer, Cham.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: Inni, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninski, and T. J. White (eds). *PCR Protocols. A Guide to Method and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp: 315–322.

Winfree, R., Bartomeus, I. y Cariveau, D. P. Native pollinators in anthropogenic habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 42, 1–22 (2011).

Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V., y Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab animal*, 47(11), 317.

