



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

Sede Rodrigo Facio

Facultad de Microbiología

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Microbiología y
Química Clínica


**Caracterización del microbioma asociado a colmenas de *Tetragonisca angustula*
(Hymenoptera:Apidae) criadas por meliponicultura en Costa Rica**

Christopher Montoya Salazar

Carné: B64620

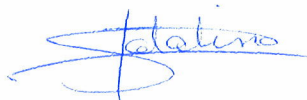
Julio, 2023

Los que aquí firmamos damos fe de que este trabajo posee todas las correcciones indicadas el día de la presentación oral de este Trabajo Final de Graduación:



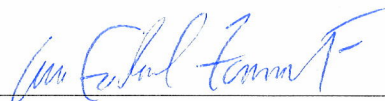
Dr. Adrián Pinto Tomas, Ph.D.

Profesor tutor



M.Sc. Catalina Murillo Cruz

Lectora



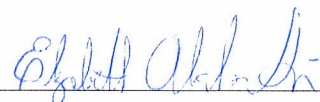
Gabriel Zamora Fallas, Ph.D.

Lector



Dr. Gilbert David Loria Masís, Ph.D.

Presidente del Tribunal



Profesor designado

Dra. Elizabeth Abrahams Sandí, Ph.D.

Índice de contenidos

Índice de contenidos	3
Índice de cuadros y figuras	5
Índice de Anexos	7
Resumen	8
1. Antecedentes	9
1.1 Análisis de comunidades microbianas	9
1.2 Importancia de las abejas sin aguijón y funcionamiento de sus colonias	12
1.3 Papel de la microbiota en las abejas	18
1.4 <i>Zymobacter palmae</i> asociado al microbioma de abejas sin aguijón	19
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos.....	23
5. Materiales y métodos	24
5.1 Recolecta de las muestras:.....	24
5.2 Extracción de material genético:	25
5.3 Construcción de librerías y secuenciación	25
5.4 Análisis bioinformático	26
5.5 Aislamiento y caracterización de las colonias de <i>Zymobacter</i> sp. a partir de muestras de miel.....	28
5.6 Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S para la confirmación del género <i>Zymobacter</i>	29
6. Resultados	30

6.1 Microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Melipona beecheii</i>	30
6.2 Beta diversidad	31
6.3 Alfa diversidad	33
6.4 Mapa de calor	40
6.5 Aislamiento de <i>Zymobacter</i> sp. recuperado de miel de <i>Tetragonisca angustula</i>	41
7. Discusión.....	43
8. Conclusiones	47
8.1 Descripción del microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de <i>Tetragonisca angustula</i> y comparación con otras dos especies de meliponas de la misma región geográfica	47
8.2 Aislar y describir morfológicamente colonias de <i>Zymobacter</i> sp. recuperadas de muestras de miel de <i>Tetragonisca angustula</i>	47
8.3 Confirmar la clasificación taxonómica dentro la familia Halomonadaceae y del género <i>Zymobacter</i> de las colonias sospechosas aisladas a partir de miel de <i>Tetragonisca angustula</i>	47
9. Bibliografía.....	48
10. Anexos.....	56

Índice de cuadros y figuras

Figura 1. Ubicación gráfica de las zonas de las cuales se obtuvieron las muestras de cámaras de cría, miel, propóleo e individuos adultos de <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Melipona beecheii</i> . <i>Nota</i> . Adaptado de <i>Mapas de Costa Rica</i> , de Freeworldmaps, 2021, Freeworldmaps (https://www.freeworldmaps.net/es/costarica/). CC BY 2.0.....	24
Figura 2. Esquema representativo del flujo de trabajo realizado previo al análisis bioinformático.	25
Figura 3. Flujo de trabajo utilizado en QIIME 2.0 para el análisis de los metadatos. <i>Nota</i> . Adaptado de <i>Conceptual overview of QIIME 2</i> , de QIIME 2, 2021, QIIME 2 (https://docs.qiime2.org/2022.2/tutorials/overview/). CC BY 2.0	27
Figura 4. Abundancia relativa de los géneros identificados por medio de la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S a partir de ADN total extraído de las cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de <i>Tetragonisca angustula</i> , <i>Scaptotrigona pectoralis</i> y <i>Melipona beecheii</i>	30
Figura 5. Análisis de disimilitud de Bray-Curtis para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	31
Figura 6. Análisis de similitud de Jaccard para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	32
Figura 7. Prueba de disimilitud unweighted unifrac para para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	33
Figura 9. Diagrama de cajas de la diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	34
Figura 10. Diagrama de cajas de la diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	35
Figura 12. Diagrama de cajas del estimador asintótico de la riqueza de especies microbianas Chao1 para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	37

Figura 13. Diagrama de cajas de la entropía de Shannon para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	38
Figura 14. Diagrama de cajas de la entropía de Shannon para la composición bacteriana de los componentes coloniales de <i>T. angustula</i> , <i>S. pectoralis</i> y <i>M. beecheii</i>	39
Figura 16. Vista de las colonias de <i>Zymobacter</i> sp. creciendo en medio ATCC 1956.	41
Figura 17. Tinción de Gram de un aislamiento de <i>Zymobacter</i> sp.....	41
Figura 18. Árbol filogenético basado en el análisis del gen ARNr 16S de distintas cepas de la familia Halomonadaceae, incluyendo la aislada de muestras de miel de <i>Tetragonisca angustula</i> (B9667_SID21).....	42

Índice de Anexos

Anexo 1. Puntajes de calidad de los cebadores utilizados en la secuenciación del ARNr 16S.....	56
Anexo 2. Cantidad de <i>reads</i> obtenidos por muestra por cada cebador durante la secuenciación del ARNr 16S.....	56
Tabla 1. Datos estadísticos representados gráficamente en el histograma anterior.....	56
Tabla 2. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para estimador asintótico de la riqueza de especies microbianas Chao1.	57
Tabla 3. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la diversidad filogenética de Faith.	57
Tabla 4. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la entropía de Shannon.	57

Resumen

Las abejas sin aguijón pertenecen a la tribu Meliponini, son las principales polinizadoras en zonas tropicales y subtropicales, son nativas de Costa Rica y algunas de sus especies han sido usadas desde hace miles de años para beneficio humano, siendo criadas por una técnica llamada meliponicultura. Tradicionalmente, la miel que producen se ha usado para combatir infecciones microbianas a nivel tópico y oral. Por tal razón, se han desarrollado muchos estudios para conocer la utilidad de las colonias de estas abejas desde el punto de vista médico, pero poco se ha hecho para comprender el papel que las bacterias juegan en las propiedades de la miel y la salud de las abejas. En el país, la especie más importante en la meliponicultura es *Tetragonisca angustula*, seguida por *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis*. Este Trabajo Final de Graduación tiene como objetivo el análisis del microbioma de *Tetragonisca angustula* y compararlo con el microbioma de *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona pectoralis*, además de aislar y caracterizar filogenéticamente una bacteria del género *Zymobacter* sp. a partir de muestras de miel de *Tetragonisca angustula*. Para tal fin, se realizó el estudio de comunidades microbianas mediante herramientas bioinformáticas analizando la región V4 del gen ARNr 16S, posteriormente, se realiza el aislamiento de *Zymobacter* sp. de las muestras de miel de *Tetragonisca angustula* y, finalmente, se lleva a cabo un análisis de 16S para la identificación a nivel de género el aislamiento de *Zymobacter* sp. Los análisis de alfa diversidad, beta diversidad y riqueza realizados a las comunidades microbianas mostraron que no había diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, exceptuando propóleo, ni entre las especies de abejas estudiadas. La cepa aislada correspondió a una especie del género *Zymobacter*, se sugieren más estudios para definir si es una nueva especie dentro del género.

1. Antecedentes

1.1 Análisis de comunidades microbianas

La complejidad de las comunidades microbianas hace que su caracterización por medio de métodos microbiológicos convencionales sea complicada debido a que muchos organismos pueden requerir condiciones de crecimiento desconocidas (o no crecer del todo en medios de cultivo) y porque es necesario no solo un muestreo en profundidad sino también utilizar técnicas para estudiar y no perder las especies menos abundantes en el proceso (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014).

La caracterización del microbioma hace uso de herramientas bioinformáticas que permiten procesar grandes cantidades de información y de modelos estadísticos que proporcionan no solo información acerca de la abundancia de especies en una región específica, sino que construye relaciones matemáticas de tal forma que las permite comparar con la abundancia obtenida en otras regiones (Carrasco, 2003).

Whittaker (1960) propuso la idea de separar la diversidad en varios componentes para facilitar su análisis, entre ellos la alfa y beta diversidad, como forma de esquematizar jerárquicamente la diversidad e incorporar el factor escala en los estudios, la cual sigue siendo relevante en la actualidad. La diversidad alfa es el número de especies a nivel local, mientras que la beta diversidad es la diferencia en composición de especies entre comunidades, permitiendo así realizar comparaciones entre comunidades de distintos niveles, considerando el número de especies y la importancia relativa de la diversidad local en cada sitio (Whittaker, 1960).

Las herramientas principales utilizadas para la caracterización del microbioma se basan en la secuenciación del genoma completo y del gen que codifica para el ARNr 16S, la secuenciación de todo el genoma permite caracterizar las comunidades microbianas al conocer la información funcional y genética, identificar diferencias entre microorganismos y detectar microorganismos poco abundantes, mientras que la secuenciación del gen ARNr 16S permite identificar las distintas especies, clasificándolas taxonómicamente (Větrovský y Baldrian, 2013; Vázquez, 2016).

El gen ARNr 16S está distribuido universalmente, por estar integrado en el cromosoma, se modifica solo por transferencia horizontal de genes, por lo que los cambios en las regiones hipervariables del gen 16S permiten establecer relaciones filogenéticas entre taxones distantes, mientras que las regiones conservadas de este gen son útiles al diseñar los cebadores de PCR adecuados para su amplificación; por estas características es que fue seleccionado por Carl Woese en 1977 como un buen marcador genético para la identificación, clasificación filogenética y evolutiva de los organismos procariotas (Větrovský y Baldrian, 2013; Gerpe, 2019).

Uno de los principales obstáculos del estudio de comunidades microbianas fue la limitación de las técnicas de secuenciación de primera generación. En situaciones con heterogeneidad genética que requiere secuenciación de múltiples genes el proceso por el método Sanger se hace largo y tedioso, además, mediante Sanger es muy difícil interpretar los resultados de una muestra donde se hallan dos o más especies (Santillán et al., 2014; Luque et al., 2017).

En el 2006, la empresa Illumina publicó un método de secuenciación de nueva generación basado en un tipo de amplificación conocida como PCR de puente en donde la secuenciación se realiza simultáneamente en millones de fragmentos de ADN, aumentando el rendimiento y permitiendo a su vez superar las dificultades a las que se enfrentaban las técnicas de secuenciación de primera generación (Escribano, 2016).

El gen ARNr 16S tiene una longitud de 1542 pb y está compuesto por nueve regiones hipervariables intercaladas por regiones conservadas (Baker et al., 2003). Al hacer uso de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S para el estudio de la microbiota asociada a cierto ambiente, es necesario amplificar una o dos de las regiones hipervariables, ya que una de las limitaciones de la secuenciación de nueva generación es que genera lecturas cortas de forma que tras los ensamblajes se obtienen amplicones de entre 250 y 500 pb utilizando Illumina (Gerpe, 2019).

Debido a esto, se debe seleccionar cuidadosamente la región a amplificar, porque es uno de los factores clave para realizar un estudio y así poder analizar la variabilidad presente en una muestra, para esta selección se debe considerar el origen de la muestra y el objetivo del estudio (Gerpe, 2019). Por ejemplo, las regiones V3-V4 proporcionan más

información útil para estudios de taxonomía y filogenia, por lo que el uso de una pareja de cebadores degenerados ayudaría a obtener mejores resultados, mientras que las regiones V4/V5 son más eficientes para estudiar la microbiota presente en el intestino de humanos y ratones (Liu et al., 2008; Klindworth et al., 2013; Kameoka et al., 2021).

Otro tipo de análisis de comunidades microbianas se basa en la metagenómica, en donde se estudia la comunidad completa en vez de cada especie por separado, ya que muchos microorganismos nunca han sido cultivados de manera independiente (Vázquez, 2016). Cuando en esta comunidad existe una especie de interés que se quiera analizar con mayor profundidad, se debe recurrir a métodos microbiológicos convencionales y de biología molecular (Bou et al., 2011).

Primero, se debe aislar el microorganismo de interés, lo que significa que la muestra debe ir lo más libre posible de contaminaciones, es decir, recuperado de cultivo “puro” para posteriormente realizar los análisis necesarios para determinar si se trata de una nueva especie, para esto se compara la secuencia obtenida con las reportadas en bases de datos como el NCBI y según el porcentaje de similitud se determina si se trata de una potencial nueva especie (Bou et al., 2011).

Para la descripción de una nueva especie, se recomienda la presencia de diferencias fenotípicas claras y en la secuencia diferencias mayores a un par de bases por cada 100 bases, en caso de que estas diferencias sean mayores al 5 %, se podría considerar la existencia de un nuevo género (Bou et al., 2011). Para la delineación de especies basada en la similitud de la secuencia del gen ARNr 16S se proponen los puntos de corte de (98,7 – 99,0) % (Kim et al., 2014; Stackebrandt, 2006).

A pesar de que muchas veces la clasificación taxonómica basada en secuenciar el gen ARNr 16S permite identificar las especies presentes en la muestra, por las limitaciones de la técnica, no siempre es posible debido a problemas en la secuenciación, preparación o transporte de la muestra; el material genético se puede degradar o la polimerasa no logra secuenciar correctamente ciertos fragmentos, por lo que se obtienen amplicones de baja calidad. En otras ocasiones es posible que se esté ante una especie microbiana nunca antes descrita; como es imposible diferenciar ambos escenarios, la descripción de nuevas especies no se puede hacer solo con base en la secuenciación del gen ARNr 16S.

La identificación de especies se determina mediante comparaciones de identidad de nucleótidos y aminoácidos promedio por pares del genoma completo (ANI y AAI, respectivamente) contra los genomas de referencia de especies depositados en la base de datos del NCBI mediante BLAST (Goris et al., 2007).

El análisis ANI revela el porcentaje de similitud en la secuencia del genoma con todas las especies conocidas del género en cuestión, utilizando un límite de especies genómicas propuesto del 95 % (Goris et al., 2007). El AAI compara el porcentaje de similitud con proteínas ortólogas contra las especies depositadas en el NCBI y usa un límite del 60 % propuesto para la delimitación del género (Rodríguez y Konstantinidis, 2014).

El porcentaje de proteínas conservadas por pares, que también tiene en cuenta el tamaño de los proteomas deducidos (Qin et al., 2014), tiene un límite de género del 50 %. Es después de haber realizado todos estos análisis que se puede confirmar que el aislado examinado representa un nuevo taxón dentro de un género. El aislamiento también se debe caracterizar a nivel fenotípico y bioquímico para realizar una descripción más completa de la nueva especie a reportar (Núñez-Montero et al., 2018).

1.2 Importancia de las abejas sin aguijón y funcionamiento de sus colonias

La tribu Meliponini pertenece al grupo de abejas de la subfamilia Apinae, la cual agrupa a todas las abejas sin aguijón que se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales (Roubik, 1989). Junto con las de la tribu Apini, son las únicas que presentan un comportamiento eusocial (Nates-Parra, 2001).

La cantidad real de especies es difícil de estimar, debido a la abundancia de especies crípticas y razas geográficas, no obstante, hay investigaciones que mencionan que en el neotrópico (desde México hasta Argentina) se encuentran 300 especies, de las cuales 59 especies de 20 géneros se han identificado en Costa Rica, lo que representa el 15 % de la diversidad mundial de estos insectos (Nates-Parra, 2001; Aguilar, 2012; Figueroa-Mata et al., 2016).

Las abejas sin aguijón son importantes para la polinización tanto doméstica como silvestre (Sparagnino et al., 2014) y se usan como alternativa de las abejas *Apis mellifera* en

la polinización comercial de cultivos agrícolas (Slaa et al., 2006). De hecho, la mayoría de árboles de las selvas tropicales no son polinizados por el viento, sino por otros agentes, entre ellos, las abejas sin aguijón, por lo tanto, las comunidades de árboles de la selva tropical costarricense se verían gravemente afectadas sin su presencia, por ejemplo, se ha comprobado que las abejas sin aguijón polinizan árboles del dosel en Corcovado (Wille, 1983).

En Costa Rica hay cerca de 8 500 especies de plantas de floración y aproximadamente un 60 % son polinizadas por especies de abejas nativas (Frankie et al., 2018). *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* son las especies que más colonias poseen en las provincias de Guanacaste y San José, además, estas dos especies son las de mayor interés comercial en el país, debido al sabor único y valor medicinal de su miel, por lo tanto, son las más usadas en la meliponicultura nacional (Aguilar et al., 2012).

Por su parte, *Scaptotrigona pectoralis* es exclusiva de bosques primarios intervenidos, presentando mayor abundancia de nidos en estas regiones, seguida en abundancia por *Tetragonisca angustula* (Barquero-Elizondo et al., 2019). En un estudio realizado en el bosque seco de la región norte de Guanacaste, *Scaptotrigona pectoralis* fue la segunda especie de abeja que más nidos presentó en la zona, mientras que *Tetragonisca angustula* fue la especie de abeja con más nidos en la zona, demostrando así su importancia en la polinización de ecosistemas específicos del país (Barquero-Elizondo et al., 2019).

Todavía se desconocen las razones por las cuales las abejas sin aguijón seleccionan un determinado sitio para establecer sus nidos o la densidad de colonias que pueden desarrollarse de manera adecuada en un espacio determinado (Barquero-Elizondo et al., 2019). No obstante, pueden nidificar en cualquier cavidad que encuentren disponible, incluso subterráneas (Nates-Parra, 1996).

La mayoría de abejas sin aguijón se caracterizan por tener aguijón reducido, alas con venación débil o reducida y ojos desnudos (Camargo y Moure, 1983). Los nidos que construyen también poseen características propias que incluso sirven para diferenciar especies, por ejemplo, la sección en donde albergan a sus crías tiene entradas conspicuas (Nates-Parra, 2001).

La entrada al nido generalmente es un tubo de cera recto, en forma de trompeta o un orificio por donde solo cabe una abeja; las celdas de cría son cilíndricas y están agrupadas formando panales dispuestos horizontalmente uno sobre otro separados por pequeñas columnas de cerumen, dejando espacio suficiente para la circulación de las abejas; la zona de cría está protegida por capas delgadas de cera (involucro) y el alimento es almacenado en potes de cerumen ubicados alrededor de la región de cría (Nates-Parra, 1996; Nogueira-Neto, 1997).

Dentro de los componentes de la colonia destaca también el propóleo, un producto apícola de aspecto resinoso y sabor amargo, con una coloración que varía entre amarillo y rojo; el propóleo consiste en una mezcla de cera y exudados resinosos de diferentes plantas que la abeja obtiene y modifica con sus secreciones salivales para utilizarlo como material auxiliar en la protección de la colmena (Bracho, 2000; Rodríguez-Pérez et al., 2020).

Los estudios de propóleos han demostrado que tanto su composición química como su actividad biológica se encuentran directamente relacionadas con las especies vegetales que colectan las abejas propolizadoras, además, las propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, antioxidantes, antitumorales, entre otras, también han sido comprobadas científicamente (Burdock, 1997; Martínez et al., 2005), sin embargo, hay pocas investigaciones enfocadas en el estudio microbiológico del propóleo.

Las meliponas se encuentran en casi todas las zonas tropicales y subtropicales a excepción de algunas islas del Pacífico, presentan una organización en colonias que pueden poseer una población desde decenas a miles de individuos obreros y una reina (Michener, 2012). Sus nidos, a diferencia de las presentes en *Apis* sp., son de forma tubular con una única abertura superior, por lo general los crean en huecos de troncos, raíces y ramas gruesas de árboles, la miel que producen presenta características distintivas como lo son un pH menor, un mayor nivel de dulzor, mayor capacidad antioxidante y otras propiedades biológicas entre las cuales se destaca su potencial actividad antibacteriana (Fletcher et al., 2020).

La organización social de una colonia de la tribu Meliponini está regida por la reina, la única hembra reproductiva de la colonia, cuya función es controlar el buen funcionamiento de la colonia mediante la liberación de feromonas que permite una labor conjunta de los

individuos favoreciendo la supervivencia de la misma y producir más individuos (obreras, machos y otras reinas) (Quezada, 2005).

El mayor número de individuos que conforman la colonia son obreras que se encargan de la construcción, acopio de recursos, alimentación de la reina y las larvas y defensa de la colonia; los zánganos son la parte reproductiva masculina y desempeñan funciones como generar calor en el área de cría, maduración de la miel y la producción de cera (Quezada, 2005).

Estas abejas tienen una forma característica de reproducir sus crías, las obreras construyen las cámaras de cría y después las abastecen de alimento larval, la reina oviposita sobre el alimento y las obreras cierran la celda para iniciar el proceso de metamorfosis que va desde huevo hasta el nacimiento de la abeja, posterior a la eclosión, la celda es destruida por las obreras para reciclar el material, este ciclo biológico de tres castas puede durar hasta más de 50 días (Aguilera-Peralta y Ferrufino-Arnéz, 2004; Quezada, 2005).

Si bien la mayoría de abejas sin aguijón se alimentan de polen y de miel, no todas utilizan polen como fuente de proteína, existen especies del género *Trigona* con hábitos necrófagos (Roubik 1982). La miel es un producto elaborado por las abejas el cual es acumulado para su posterior consumo dentro del nido.

Los seres humanos han extraído y aprovechado la miel desde hace miles de años, siendo hoy el producto apícola de mayor demanda. La técnica de crianza de estos insectos de la familia Apidae para el aprovechamiento de sus productos se denomina apicultura si son del género *Apis* o meliponicultura si son de la tribu Meliponini, comúnmente llamadas abejas sin aguijón (Parra y Londoño, 2013).

La composición de la miel de ambas es muy similar, estando constituidas principalmente de azúcares (80 %), agua (17 %) y el restante (3 %) corresponde a un listado de casi 200 compuestos diferentes donde se destaca un alto contenido de vitaminas, aminoácidos y minerales (Gonnet, 1986). Su amplio valor nutricional correlaciona con sus componentes, la cantidad y composición de estos varía en gran medida según las fuentes de néctar que se emplearon para la producción de la miel (Gonnet, 1986; Zulkhairi et al., 2018).

En América Central, las actividades de meliponicultura se han realizado desde el período precolombino, en la actualidad, esta práctica aún se realiza en Costa Rica, siendo la miel el producto más comercializado derivado de esta práctica, la cual se desarrolla principalmente en la provincia de Guanacaste y Puntarenas con una diversa variedad de abejas sin aguijón donde destacan *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula*, estas tres especies son, a su vez, las abejas sin aguijón de mayor interés comercial; su miel, además de utilizarse para consumo directo, se ha empleado por sus propiedades medicinales para tratar la tos, dolor de ojos, aplicar en heridas y quemaduras (MAG, 1984).

El primer reporte de la actividad antimicrobiana de la miel apareció en 1992, en mieles producidas por el género *Apis*, desde ese momento se ha estado investigando qué le confiere estas propiedades medicinales a la miel, ya que se demostró que posee una eficacia contra un amplio rango de bacterias, además de actividad antifúngica (Molan, 1992).

En un inicio, la actividad antimicrobiana se le atribuyó a un efecto osmótico por la alta concentración de azúcares, pero los estudios de inhibición de crecimiento bacteriano realizados entre miel artificial (compuesta únicamente por agua y azúcares) y real demostró que, a pesar de jugar un rol secundario, el alto contenido de azúcar no es la que genera la acción antibacteriana (Linder, 1962).

De forma similar se descartó la acción del pH ácido (3,2 - 4,5) y se terminó confiriendo esta actividad a la concentración de peróxido de hidrógeno que se genera por la actividad enzimática de la glucosa oxidasa en miel y a las sustancias antimicrobianas derivadas de las plantas donde se adquiere el néctar para su producción (Dolezal et al., 1988; Molan, 1992; White et al., 1963).

Estudios posteriores donde se añadía catalasa a la miel para eliminar el peróxido de hidrógeno demostraron que, en las mieles de mayor actividad antibacteriana como la Manuka® de Nueva Zelanda, este peróxido representaba una pequeña parte de participación en la inhibición del crecimiento bacteriano, lo que dirigió los estudios de la actividad a los compuestos provenientes de las plantas que emplean las abejas (Nolan et al., 1988; Dolezal et al., 1988).

En la actualidad, se han descrito una gran variedad de compuestos activos de la miel involucrados en la actividad antibacteriana, algunos son derivados del polen y néctar que las abejas emplean y otras producidos por las mismas abejas (Copper, 2016), un ejemplo del segundo caso son las jelleinas de la principal proteína de la jalea real (MRJP1), esta ha demostrado tener un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y negativas e incluso contra *Candida albicans* (Brudzynki y Sjaarda, 2015).

También se ha demostrado que el metilglioxal (MGO) hallado en el néctar de las flores manuka es uno de los principales responsables de la actividad antibacteriana de esta miel (Mavric et al., 2008).

Por otra parte, se ha reportado que la miel de melipónidos tiene mayores efectos inhibitorios contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que la miel de *Apis mellifera* criadas en la misma región (Zamora y Arias, 2011; Zamora et al., 2013). También se ha demostrado el bajo riesgo a la salud que conlleva el uso de la miel de melipónidos en la curación de heridas y la acción antimicrobiana de amplio espectro contra microorganismos de relevancia médica, sin importar si estos presentan resistencia a los antibióticos o no (Zamora et al., 2014).

Debido a sus propiedades, la miel se emplea, por ejemplo, con fines médicos empíricos como en el producto Medihoney[®] hecho en Australia y licenciado en 1999 que es empleado para el tratamiento complementario de quemaduras y heridas cutáneas con el fin de evitar infecciones secundarias, productos similares han surgido en Holanda y Reino Unido (Cooper, 2016).

Aunque existe un creciente interés científico en este componente, las interesantes características de la miel han sido poco estudiadas debido a la dificultad que provoca el análisis de una gran diversidad de especies microbianas presentes en ella, la compleja química de la miel y amplias variaciones en su composición (Fletcher et al., 2020).

1.3 Papel de la microbiota en las abejas

A pesar de las propiedades antimicrobianas de la miel anteriormente descritas, existen microorganismos capaces no solo de sobrevivir en ese ambiente hostil, sino también de crecer y reproducirse tanto en la miel como en los otros componentes de la colmena y hasta en las mismas abejas, inclusive la actividad biológica de algunos de ellos podría explicar parte de la capacidad antimicrobiana de la miel que aún no ha sido dilucidada.

Este tipo de asociaciones simbióticas han sido ampliamente descritas en insectos. La microbiota es un factor crucial para la salud del huésped (Engel y Moran, 2013), en insectos específicamente, estas comunidades microbianas no suelen ser diversas (Jones et al., 2013), pero juegan un rol vital para especies como *Tetragonisca angustula*.

Evans y colaboradores (2006) demostraron que en las abejas existen genes de expresión reducida comparada con *Drosophila* y *Anopheles* asociados a inmunidad y se ha propuesto que dicha reducción podría estar compensada con la presencia de comunidades microbianas que cumplirían funciones de defensa (Moran et al., 2005; Gerardo *et al.*, 2010).

Las abejas melíferas adultas poseen una microbiota intestinal característica y conservada que mantienen por transmisión entre individuos dentro de la colmena más que por adquisición selectiva de microorganismos del medio externo, aunque también puede darse por el consumo de polen; debido a esto, se puede extrapolar que el origen geográfico no influye significativamente en el microbioma de poblaciones distintas de *Tetragonisca angustula*, pero sí influye la especie de abeja, el tamaño y número de integrantes en la colonia (Kačániová et al., 2004; Kwong et al., 2014).

La microbiota desempeña funciones esenciales para la fisiología, biología, ecología y evolución de las abejas (Hamdi et al., 2011), por ejemplo, los insectos biosintetizan ácidos grasos, pero carecen de las enzimas necesarias para la síntesis de compuestos como esteroides que también son necesarios para su desarrollo y nutrición.

Por lo anterior, los insectos se han visto en la necesidad de establecer relaciones estrechas con microorganismos que llevan a cabo esta función (Paludo et al., 2018). En

Apis mellifera, por ejemplo, se ha encontrado *Epicoccum* en polen maduro, hongo asociado con frecuencia a la necromasa de varias plantas y que es capaz de producir antibióticos, evitando la proliferación de patógenos en abejas (Piccini et al., 2004).

En *Tetragonisca angustula* se ha encontrado que *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus marisflavi* y *Lysinibacillus massiliensis* están presentes como simbiontes y el análisis de la variación de sus abundancias permite evidenciar disbiosis que indica la presencia de un agente que ocasiona una disrupción en la homeostasis de los simbiontes, causando deterioro en la colonia, sin embargo, faltan estudios para poder definir con mayor exactitud este tipo de relaciones, ya que, aunque *Bacillus amyloliquefaciens* parece ser un simbionte, se ha visto que no está alojado en los intestinos de abejas juveniles sanas (Mejía-Torres, 2020).

En otros casos, *Bacillus velezensis* se encuentra distribuida más ampliamente en abejas de colonias enfermas respecto a lo observado en abejas sanas y *Microbacterium paraoxidans*, ausente en colonias sanas, se aisló de todas las abejas e intestinos en colonias con señales de deterioro en una investigación realizada por Mejía-Torres (2020).

1.4 *Zymobacter palmae* asociado al microbioma de abejas sin aguijón

De las diferentes bacterias presentes en la miel de abejas sin aguijón, este trabajo se enfocará en *Zymobacter palmae*, debido a su importancia a nivel biotecnológico, ya que es de los pocos microorganismos capaces de utilizar manitol como sustrato para la producción de etanol por poseer el gen de la piruvato carboxilasa, una enzima clave para todas las rutas homofermentadoras de etanol, cuya secuencia le hace tener propiedades bioquímicas que pueden ser ventajosas para el desarrollo de nuevos biocatalizadores para la producción de etanol combustible (Horn et al., 2000; Raj et al., 2002).

Zymobacter palmae fue descrita en el año 1993 y fue aislada de savia de palma en Japón (Okamoto et al., 1993). *Zymobacter* pertenece a la familia Halomonadaceae, esta constituye una rama independiente de la clase Gammaproteobacteria e incluye los géneros marinos *Halomonas* y *Chromohalobacter* (de la Haba, 2010).

En contraste con estos géneros, *Zymobacter* es de origen terrestre, no es halófila ni halotolerante, es anaerobia facultativa, produce etanol y CO₂ usando maltosa, glucosa o manitol como sustrato (Okamoto et al., 1993; Horn et al., 2000). La similitud de ácidos nucleicos entre los ARNr 16S de estos géneros es de aproximadamente el 90 % y, al igual que *Halomonas* y *Chromohalobacter*, *Zymobacter* demuestra las regiones altamente conservadas necesarias para colocarlo en la familia Halomonadaceae. *Zymobacter* difiere de *Chromohalobacter* y *Halomonas* en las posiciones de ARNr 16S 1424, 1439, 1462 y 1464 (sistema de numeración *E. coli*) (Dobson y Franzmann, 1996).

Quimiotaxonómicamente, la familia Halomonadaceae comparte el sistema respiratorio ubiquinona-9 (Hamana et al., 1994). *Zymobacter* es un género fenotípica y ecológicamente similar a los géneros productores de etanol *Zymomonas* y *Saccharobacter*, ambos prefieren los mismos nichos. No obstante, *Zymobacter* se diferencia de estos dos géneros por flagelación, fermentación de ciertos azúcares, requerimientos de vitaminas para el crecimiento, tolerancia osmótica, porcentaje de moles de G + C de ADN y su sistema de ubiquinona (Okamoto et al., 2015).

El genoma completo de *Zymobacter palmae* fue ensamblado en el 2018 (GenBank: AP018933.1), mostrando que contiene un gen que codifica para una α -glucosidasa, una enzima capaz de disrumir los principales componentes de la matriz de la biopelícula presentes en bacterias, los exopolisacáridos (Sutherland, 2001). Esta característica le da el potencial de tener aplicaciones en el ámbito médico para tratar infecciones provocadas por bacterias formadoras de biopelículas y podría ayudar a explicar las propiedades antimicrobianas de la miel de especies como *Tetragonisca angustula*, ya que *Zymobacter palmae* ha sido asociado al microbioma de miel de *Tetragonisca angustula* criadas por meliponicultura en Costa Rica (Viquez, 2022).

En estudios previos utilizando técnicas independientes de cultivo se ha logrado detectar *Zymobacter* sp. en la miel de *Tetragonisca angustula*, pero no en otros componentes de la colonia (Viquez, 2022). Este trabajo se propone confirmar la presencia de especies pertenecientes al género *Zymobacter* en colonias de tres distintas abejas sin aguijón, para sentar las bases que permitan dilucidar la asociación simbiótica entre *Zymobacter* sp. y *Tetragonisca angustula* la cual podría ser específica y no estar presentes en otras especies

de melipónidos. Para ello se analizan tres especies de abejas sin aguijón de tres sitios geográficos distintos en Costa Rica, para luego proceder a aislar *Zymobacter* sp. una vez confirmada su presencia en el microbioma del componente colonial analizado.

2. Justificación

Aproximadamente el 70 % de las angiospermas dependen de polinizadores para su reproducción, siendo las abejas los invertebrados más significativos que participan en el proceso de polinización y ellas, así como otros insectos polinizadores, mejoran la producción de alimentos de dos mil millones de pequeños agricultores en todo el mundo, ayudando a garantizar la seguridad alimentaria de la población mundial (Carvajal, 2020; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, 2018).

En los ecosistemas agrícolas y agroforestales, las abejas *Apis mellifera* son las que realizan la mayor parte de la actividad polinizadora, pero en los ecosistemas naturales como bosques tropicales, bosques secos, páramos, entre otros, son las abejas autóctonas las que polinizan y mantienen estos ambientes, siendo *Tetragonisca angustula* de vital importancia en Costa Rica para el mantenimiento de los ecosistemas naturales y su enorme biodiversidad, ya que muchas de estas abejas han coevolucionado con la flora y han desarrollado estrategias y dependencias sobre ciertas especies vegetales, de tal manera que si desaparece una de las dos, ambas se extinguen (Carvajal, 2020).

Gracias a la difusión acerca de los beneficios económicos y ambientales de la meliponicultura se ha generado un crecimiento que no necesariamente ha ido acompañado del conocimiento de las especies (Rosso-Londoño y Nates-Parra, 2005). El desconocimiento por parte de algunos criadores en cuanto a las condiciones de manejo de las colonias puede generar problemas nutricionales o enfermedades en las abejas (Shanks, 2015).

Las abejas, como todos los seres vivos del planeta, han desarrollado relaciones simbióticas con microorganismos, los cuales les aportan ventajas evolutivas como nuevas características primarias o secundarias y mejorando su salud al actuar como competidores de microorganismos patógenos (solo por mencionar un mecanismo inmunoprotector), entre otras ventajas (Douglas, 2014).

No obstante, para las abejas sin aguijón no se conocen suficientemente las asociaciones con microorganismos al mismo nivel de detalle que se conocen estas asociaciones en otras especies de abejas como *A. mellifera*, por ejemplo, en las que se ha observado que la presencia de levaduras, mohos y bacterias incide en su estado nutricional, en la capacidad de defensa inmune y en el estado de la colonia, más aún en el caso de los insectos sociales que facilitan la asociación de una microbiota particular que no es posible encontrar en insectos solitarios (Fürst et al., 2014; Engel y Moran, 2013).

Desde el año 2014 se ha documentado una serie de síntomas de deterioro de las colonias de *T. angustula* que finalmente termina en la muerte de estas y a pesar del uso de diferentes metodologías para diagnosticar la causa, no se ha podido evidenciar la presencia de algún patógeno bacteriano o viral conocido (Mejía-Torres, 2020).

No se puede descartar la probabilidad de que algún microorganismo sea el agente causal debido a que por la limitada cantidad de información relacionada a la microbiota natural de *Tetragonica angustula* se desconoce si para la población específica afectada existe una alteración o desproporción de las especies dentro de la microbiota nativa que puede conducir a una enfermedad (Mejía-Torres, 2020).

Por otra parte, a la miel de abejas sin aguijón se le atribuyen propiedades curativas, debido a su capacidad antimicrobiana y antibiopelícula, incluso mayores a las de *A. mellifera* en las mismas regiones, sin embargo, se desconocen las razones que dan origen a estas propiedades (Zamora et al., 2013).

El efecto antimicrobiano que presentan las mieles de abejas sin aguijón de Costa Rica no se puede explicar por sí mismo por la concentración de azúcares (efecto osmótico) ni por su nivel de acidez ni por la concentración de peróxido de hidrógeno ni tampoco por las sustancias antimicrobianas derivadas de las plantas de donde estas abejas adquieren néctar ni siquiera a una combinación de todos los factores anteriores (Zamora, 2018; Dolezal et al., 1988; Molan, 1992; White et al., 1963).

Por lo tanto, el análisis del microbioma presente en los componentes de la colmena de *Tetragonica angustula* podría arrojar luz en la búsqueda de una mejor explicación sobre las propiedades antimicrobianas presentes en la miel. Para esto es importante confirmar si

Zymobacter sp. forma parte del microbioma de la miel de *Tetragonisca angustula*, exclusivamente. En este trabajo, colonias de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii* serán analizadas para determinar la presencia de *Zymobacter* sp. en los distintos componentes de sus colonias.

A su vez, el aislamiento e identificación preliminar de *Zymobacter* sp. servirá de base para futuros estudios que exploren su papel en las propiedades antimicrobianas de la miel, así como su potencial médico y biotecnológico. Además, contar con aislamientos en cultivo puro constituye el primer paso para determinar si se trata de una nueva especie, su rol en la salud de la colonia y su interacción biológica con *Tetragonisca angustula*.

3. Hipótesis

Bacterias pertenecientes al género *Zymobacter* están asociadas exclusivamente con la miel de colonias de *Tetragonisca angustula* criadas por meliponicultura en Costa Rica.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar el microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii* criadas por meliponicultura en Costa Rica mediante el uso de herramientas de secuenciación de nueva generación Illumina® MiSeq™ y análisis bioinformáticos y aislar bacterias del género *Zymobacter* a partir de los componentes coloniales donde se encuentre en abundancia.

4.2 Objetivos específicos

1. Describir el microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula* y compararla con otras dos especies de meliponas de la misma región geográfica.
2. Aislar y describir morfológicamente colonias de *Zymobacter* sp. recuperadas de muestras de miel de *Tetragonisca angustula*.
3. Confirmar la clasificación taxonómica dentro la familia Halomonadaceae y del género *Zymobacter* de las colonias sospechosas aisladas a partir de miel de *Tetragonisca angustula*.

5. Materiales y métodos

5.1 Recolecta de las muestras: Se recolectaron muestras de cámaras de cría, miel, propóleo e individuos adultos de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii* de nueve colmenas (tres colmenas por especie) ubicadas en las siguientes comunidades: Atenas, Alajuela (9.97325 - 84.40775), Pilas de Canjel, Puntarenas (9.971167 - 85.219056) y La Cruz, Guanacaste (11.022222-85.669889 y 11.160408 -85.589503) (Figura 1). Seguidamente, las muestras fueron trasladadas utilizando hieleras hasta el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, lugar en el que en condiciones asépticas se separaron y congelaron a -80 °C.



Figura 1. Ubicación gráfica de las zonas de las cuales se obtuvieron las muestras de cámaras de cría, miel, propóleo e individuos adultos de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii*. Nota. Adaptado de *Mapas de Costa Rica*, de Freeworldmaps, 2021, Freeworldmaps (<https://www.freeworldmaps.net/es/costarica/>). CC BY 2.0

5.2 Extracción de material genético: Las extracciones se realizaron con el DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante e incorporando algunas modificaciones según el tipo de muestra. En total, el Grupo de Investigación en Simbiosis Hospedero-Microorganismo (GISiHM) de la Universidad de Costa Rica procesó 117 muestras: 25 de cámaras de cría, 26 de miel, 27 de adultos, 27 de propóleos, nueve controles negativos de extracción y tres controles negativos de amplificación. Para cada extracción se determinó la concentración de ácidos nucleicos en nanogramos por microlitro, así como las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 empleando el NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Además, para determinar la calidad del ADN se visualizaron geles de agarosa al 1 % y, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se amplificó el gen que codifica para el ARNr 16S con el uso de los imprimadores universales 27F y 1492R (Frank et al., 2008), posteriormente se visualizaron con Gelred® (Biotium, California, Estados Unidos) en geles de agarosa al 1 %.

5.3 Construcción de librerías y secuenciación: Las extracciones de ADN se enviaron al laboratorio del Dr. Garret Suen de la Universidad de Wisconsin-Madison, Estados Unidos, quienes se encargaron de la construcción de librerías utilizando la región V4 del gen que codifica para el ARNr 16S y la posterior secuenciación de los insertos de ADN con la plataforma de Illumina MiSeq™ (Kozich et al., 2013) (Figura 2).

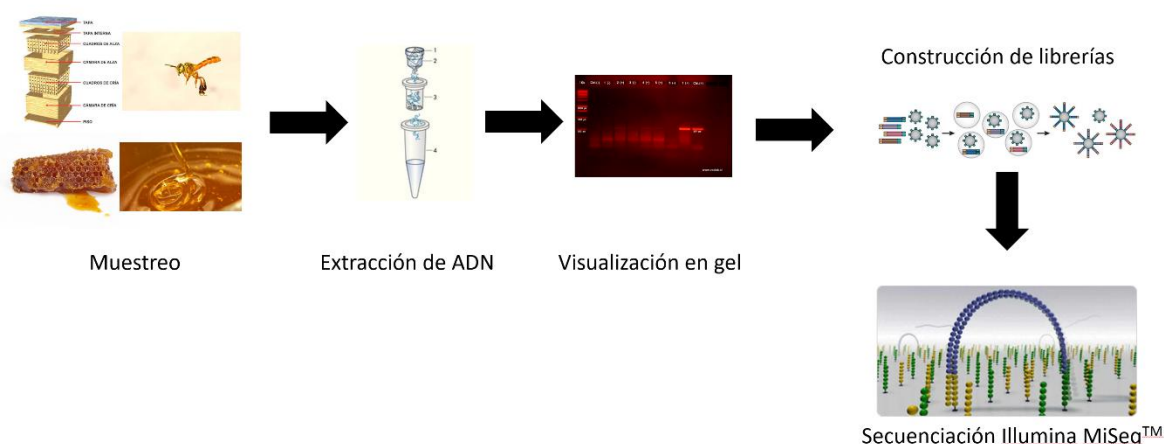


Figura 2. Esquema representativo del flujo de trabajo realizado previo al análisis bioinformático.

5.4 Análisis bioinformático: Este análisis se realizó inicialmente con el fin de identificar todas las especies bacterianas presentes en la microbiota asociada a las muestras de miel, cámara de cría, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula*, utilizando Quantitative Insights Into Microbial Ecology v2.0.1 (QIIME 2.0) y el protocolo DADA2 (QIIME2, 2021).

Las secuencias pareadas y demultiplexadas fueron importadas a la plataforma bioinformática QIIME 2.0 y se visualizaron como diagramas de calidad interactivos para determinar el sitio de corte de las secuencias y los parámetros de *trimming* para proceder con el *denoising* y *clustering*.

Basado en los puntajes de calidad de dicho diagrama, las lecturas directas fueron truncadas a 190 pares de bases y las reversas a 105 pares de bases, según los estándares mínimos de aceptación para puntajes de calidad; no se realizó ningún recorte al inicio de las secuencias.

Los pasos de *denoising* y *clustering* se realizaron con el algoritmo DADA2 con el objetivo de agrupar las secuencias con diferencias de hasta un par de bases en unidades taxonómicas operativas (OTUs), que se utilizaron en los análisis posteriores.

La tabla de *features* y secuencias representativas para OTUs fueron generadas con QIIME 2.0. El árbol de diversidad filogenética fue procesado usando secuencias representativas y el complemento *fasttree* acoplado con alineamiento *mafft* de QIIME 2.0. Las taxonomías de secuencias representativas de OTUs fueron asignadas usando un clasificador entrenado, SILVA_138.1_SSURef_NR99_tax_silva (Figura 3).

Los datos fueron importados al software R en dónde se eliminaron todas las OTUs asignadas a cloroplastos, mitocondrias y taxonomía Eucariota. Además, se realizó una rarefacción de las muestras para que todas quedaran con un mínimo de 3000 secuencias.

En este proceso se descartaron cinco muestras de propóleo con los códigos: 1Ta-P-1 (AP120819-Ta-P-1.1), 1Ta-P-3 (AP120819-Ta-P-3.3), 2Ta-P-3 (AP270819-Ta-P-3.1), 3Ta-P-1 (AP170220-Ta-P-1.1), 3Ta-P-2 (AP170220-Ta-P-2.2) debido a que tenían menos de 3000 secuencias luego de los procesos de filtrado.

Además, por la misma razón, se eliminaron los nueve controles de extracción de material genético (Blanco-A1, Blanco-A2, Blanco-C1, Blanco-C2, Blanco-M1, Blanco-M2, Blanco-P1, Blanco-P2, RepCE) y los tres controles de secuenciación (pcrneg1, pcrneg2 y pcrneg3).

A partir de estos datos se realizaron análisis de diversidad α (número de OTU e índice de Faith phylogenetic diversity). La diversidad β se calculó basándose en las matrices de disimilitud Bray-Curtis, Unweighted UniFrac, Weighted UniFrac y Jaccard, mediante las librerías *vegan* y *phyloseq* del paquete R (Rodrigues, 2018).

Se graficaron los valores de α diversidad mediante *boxplot* para cada tipo de muestra y especie y se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis acompañada de una prueba de Dunn para identificar diferencias entre grupos (Guachamin-Rosero, 2020).

Para visualizar las matrices de β diversidad se utilizó un análisis de componentes principales, mediante las matrices de disimilitud mencionadas anteriormente. Se realizaron gráficos de barra de las abundancias relativas de los filos, clases, órdenes, familias y géneros más abundantes en cada muestra y también se elaboró un mapa de calor de abundancia relativa de las 20 OTUs más abundantes en cada muestra.

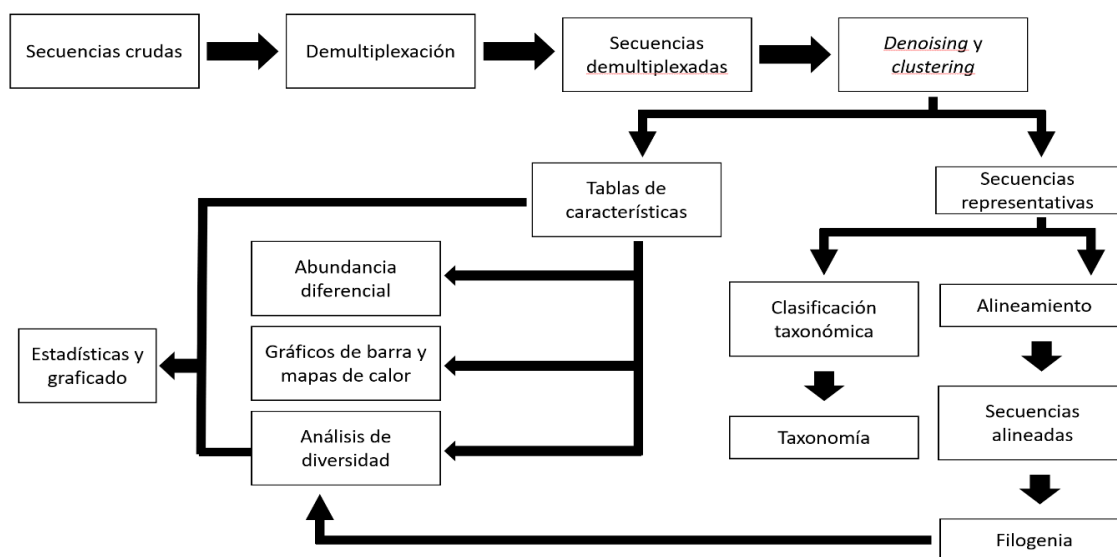


Figura 3. Flujo de trabajo utilizado en QIIME 2.0 para el análisis de los metadatos. *Nota.* Adaptado de *Conceptual overview of QIIME 2*, de QIIME 2, 2021, QIIME 2 (<https://docs.qiime2.org/2022.2/tutorials/overview/>). CC BY 2.0

5.5 Aislamiento y caracterización de las colonias de *Zymobacter* sp. a partir de muestras de miel

Se tomaron las muestras de las colonias de *Tetragonisca angustula* ubicadas en el Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional de Costa Rica, Heredia, recolectando la miel con una jeringa estéril. El material se colocó en tubos estériles de 15 mililitros rotulados con la muestra, sitio y especie de procedencia, estos se mantuvieron a 4 °C durante su traslado hacia el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, Universidad de Costa Rica, donde se procesaron en menos de 24 horas después de su recolecta.

Para llevar a cabo el aislamiento de las bacterias del género *Zymobacter*, se utilizaron tres medios de cultivo semisólidos: ATCC medium: 1956 Medio Levadura, medio miel-peptona y el medio descrito por Okamoto y colaboradores (2015) para el crecimiento selectivo de *Zymobacter palmae*.

Posteriormente, se inocularon 100 microlitros de las diferentes muestras de miel en cada uno de los medios por duplicado y se incubaron a 30 °C por cuatro días, una placa en aerobiosis y la otra en anaerobiosis, utilizando la cámara anaeróbica BACTRONEZ (Sheldon Manufacturing, Oregon, Estados Unidos).

De los cultivos obtenidos, se procedió a realizar tinción de Gram, según el procedimiento descrito por Rodríguez y Arenas (2018), para identificar colonias sospechosas de *Zymobacter* sp. Las colonias sospechosas fueron posteriormente aisladas en el medio descrito por Okamoto y colaboradores (2015) para el crecimiento selectivo de *Zymobacter palmae*. Luego de cuatro días de crecimiento a 30 °C, se revisó la placa para comprobar crecimiento de solo un morfotipo colonial, concordante con lo esperado para *Zymobacter* sp. y se volvió a realizar la tinción de Gram para verificar que se observaran bacilos Gram negativos uniformes entre ellos.

5.6 Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S para la confirmación del género *Zymobacter*.

Finalmente, se realizó un análisis filogenético del gen ribosomal 16S proveniente del aislamiento obtenido en el laboratorio (B9667_SID21). Para este análisis se utilizaron secuencias de otros aislamientos de referencia de la familia Halomonadaceae disponibles en la base de datos GenBank. Las secuencias se alinearon mediante la plataforma GUIDANCE2, se buscó el mejor modelo evolutivo con el software MEGA X, el cuál fue el GTR con distribución gamma y proporción de sitios invariables.

Las secuencias fueron analizadas en el software BEAST v.2, usando el modelo GTR G+I, donde se realizó la inferencia bayesiana con 10 millones de generaciones y se eliminaron las primeras 2,5 millones. El árbol final se visualizó en la plataforma iTOOL.

6. Resultados

6.1 Microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii*: En cuanto a la frecuencia relativa de especies, existe un predominio de bacterias del género *Lactobacillus* en todos los tipos de muestra de las tres especies de abejas sin aguijón estudiadas, excepto en los propóleos (Figura 4). Importante resaltar la presencia de *Zymobacter* únicamente en muestras de miel de *Tetragonisca angustula*.

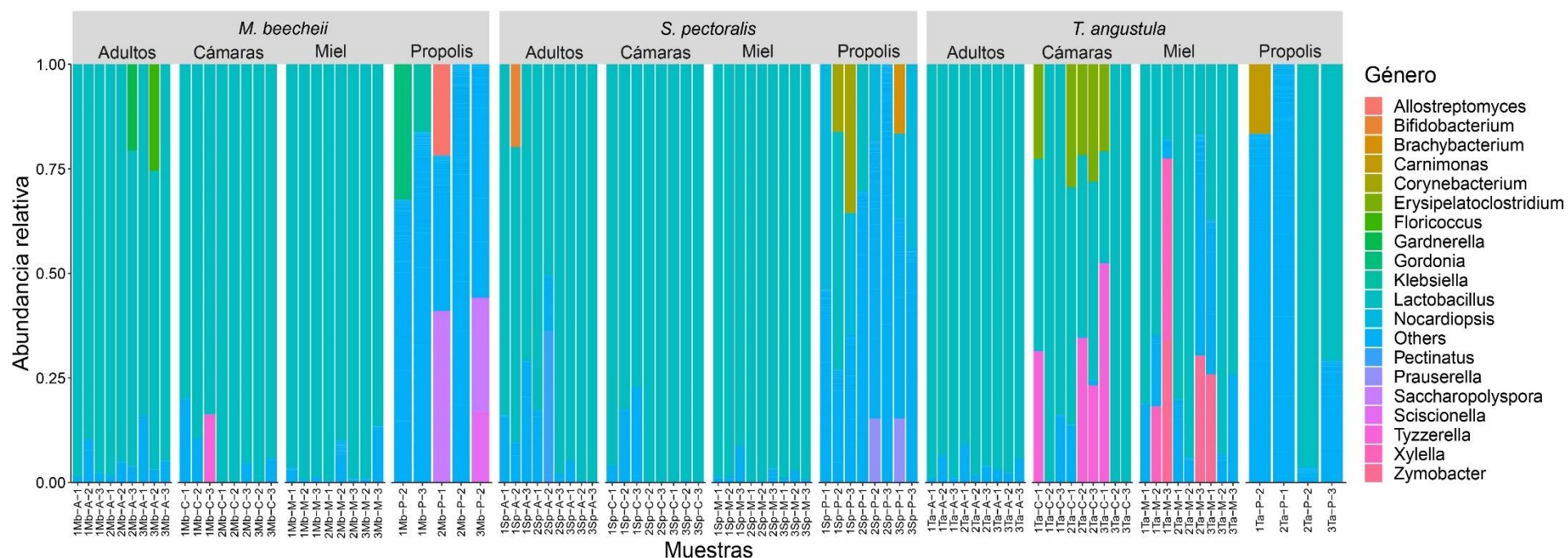


Figura 4. Abundancia relativa de los géneros identificados por medio de la secuenciación parcial del gen que codifica para el ARNr 16S a partir de ADN total extraído de las cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii*.

6.2 Beta diversidad

Se muestran los resultados obtenidos usando la métrica de disimilitud de Bray-Curtis, pudiendo así observar qué tan diferentes son las muestras entre sí al crear una gráfica de coordenadas principales de la matriz de distancias de dicha métrica.

Según el tipo de muestra, se observó que la mayoría de muestras de miel y propóleo tienen una composición microbiana con baja disimilitud entre ellas, pero con una disimilitud significativa con respecto a los otros dos tipos de muestra. En el caso de adultos y cámaras de crías, estas forman pequeños grupos entre algunas de ellas, dispersos en el gráfico, indicando una relación de disimilitud entre los microbiomas de los adultos, las cámaras de cría y entre ellas mismas que en ocasiones puede no ser significativa (Figura 5).

Además, se puede observar que las disimilitudes son dependientes de la especie, siendo las más significativas dadas por muestras provenientes de diferentes especies. Las muestras de cada especie tienden a formar pequeñas agrupaciones que indican la baja disimilitud entre ellas, no obstante, hay una cantidad significativa de muestras de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* que comparten una abundancia de especies similar.

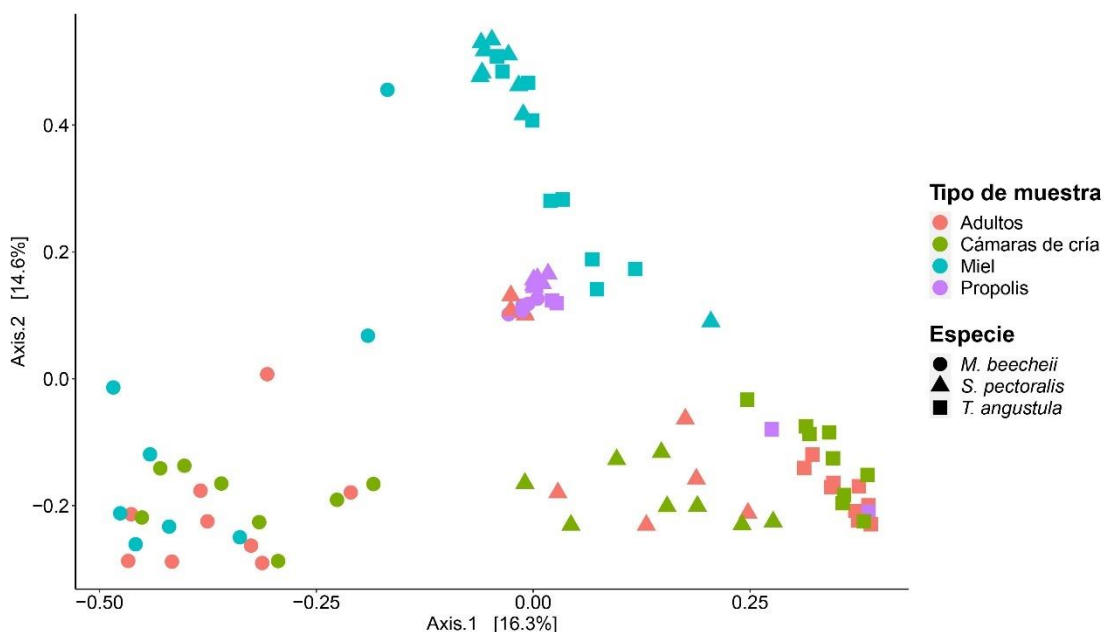


Figura 5. Análisis de disimilitud de Bray-Curtis para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

El índice de similitud de Jaccard indica que las muestras de propóleo son las que contienen comunidades microbianas más similares entre ellas.

Al analizar la especie de origen de cada muestra, se observa cómo, igualmente, las similitudes se dan principalmente entre muestras provenientes de una misma especie y las diferencias se hacen significativas cuando se observa la distancia en la matriz entre muestras de diferentes especies, exceptuando unas pocas muestras de *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula* que se asemejan en composición a muestras obtenidas de *Scaptotrigona pectoralis* (Figura 6).

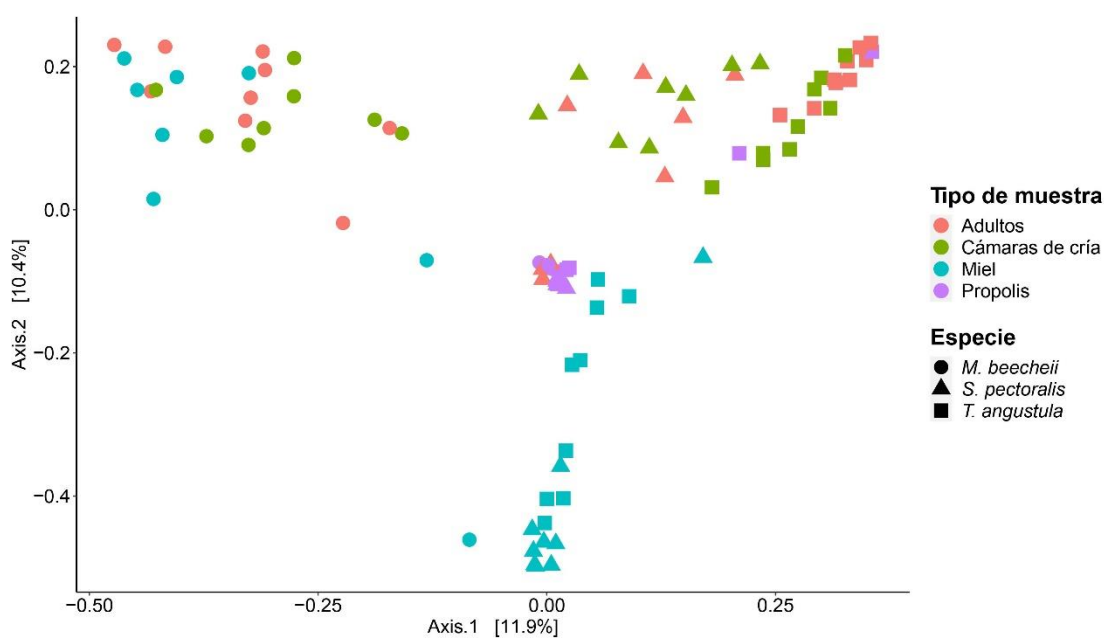


Figura 6. Análisis de similitud de Jaccard para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

Para el caso de la medida de distancia utilizando unweighted unifrac, se observa cómo las muestras de propóleo tienen una composición microbiana similar, así como la mayoría de muestras de cámara de cría, sin importar su especie de procedencia, mientras que las muestras de adulto y miel tienen una disimilitud significativa entre ellas y con las demás muestras (Figura 7).

Cuando se analiza la especie de procedencia en la métrica de unweighted unifrac, se observa una disimilitud significativa en el microbioma de las tres especies de abeja, no se distinguen patrones de agrupación entre las muestras.

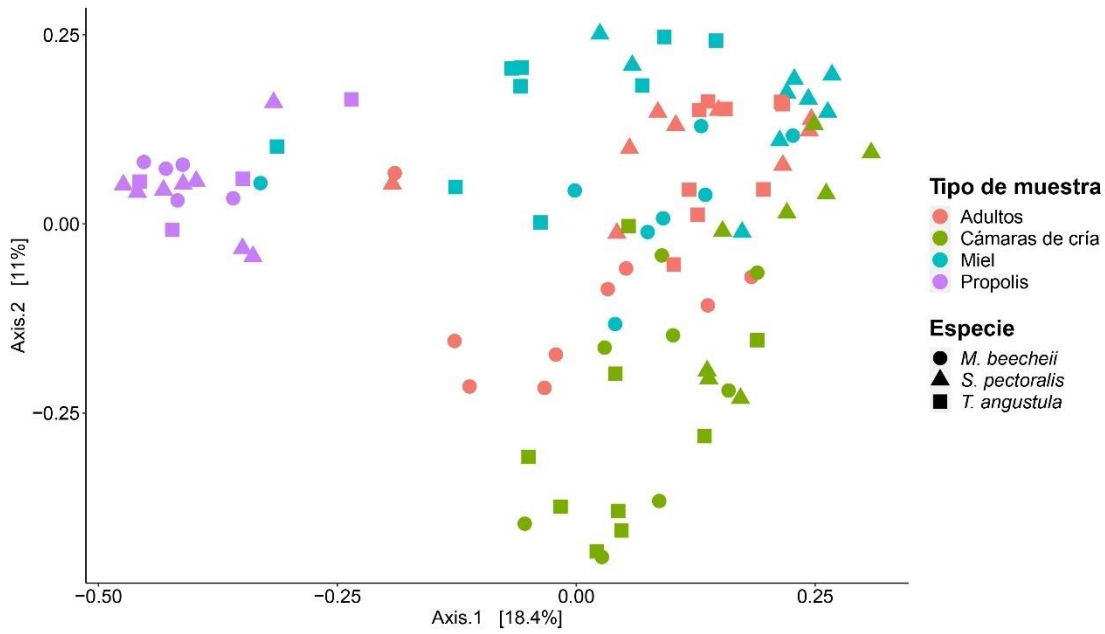


Figura 7. Prueba de disimilitud unweighted unifrac para para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

6.3 Alfa diversidad

Para el análisis de alfa diversidad se muestran los diagramas de la diversidad filogenética de Faith, Chao1 y el índice de Shannon.

Las muestras de propóleo muestran una mayor diversidad filogenética en comparación con las otras tres muestras, las cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Figura 8).

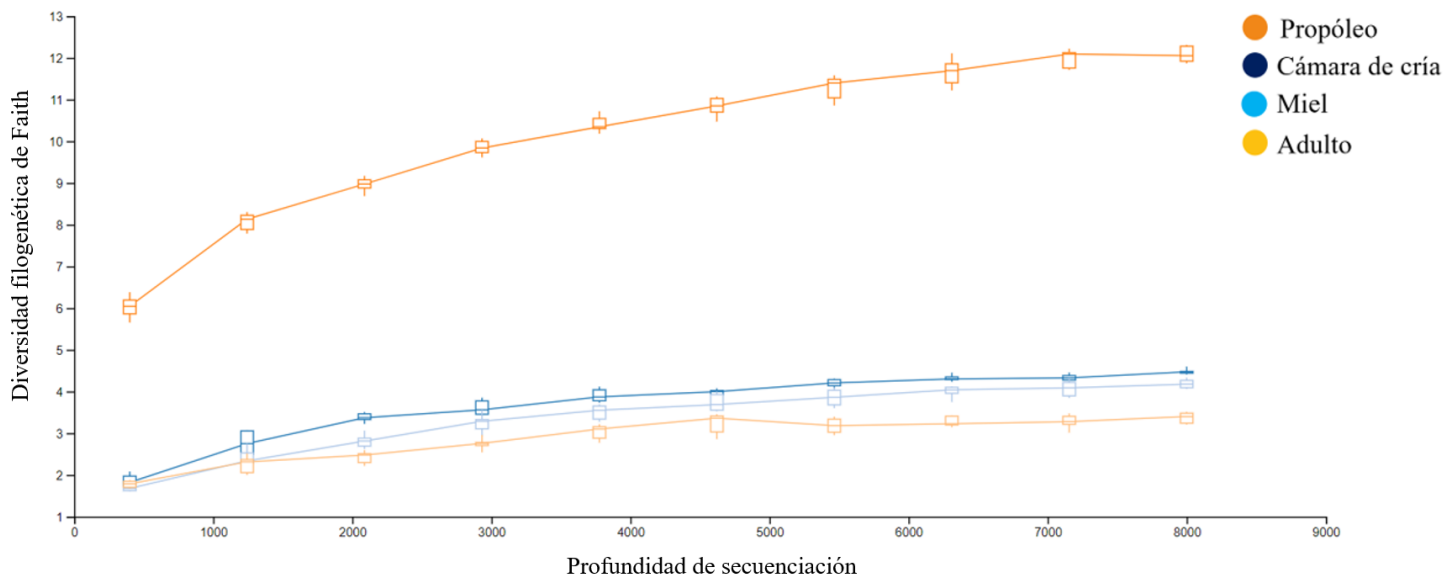


Figura 8. Diagrama de la diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

Al observar el índice de diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales se destaca el propóleo como el componente de la colonia que más diversidad microbiana posee, con una diferencia estadísticamente significativa del resto de componentes (Figura 9).

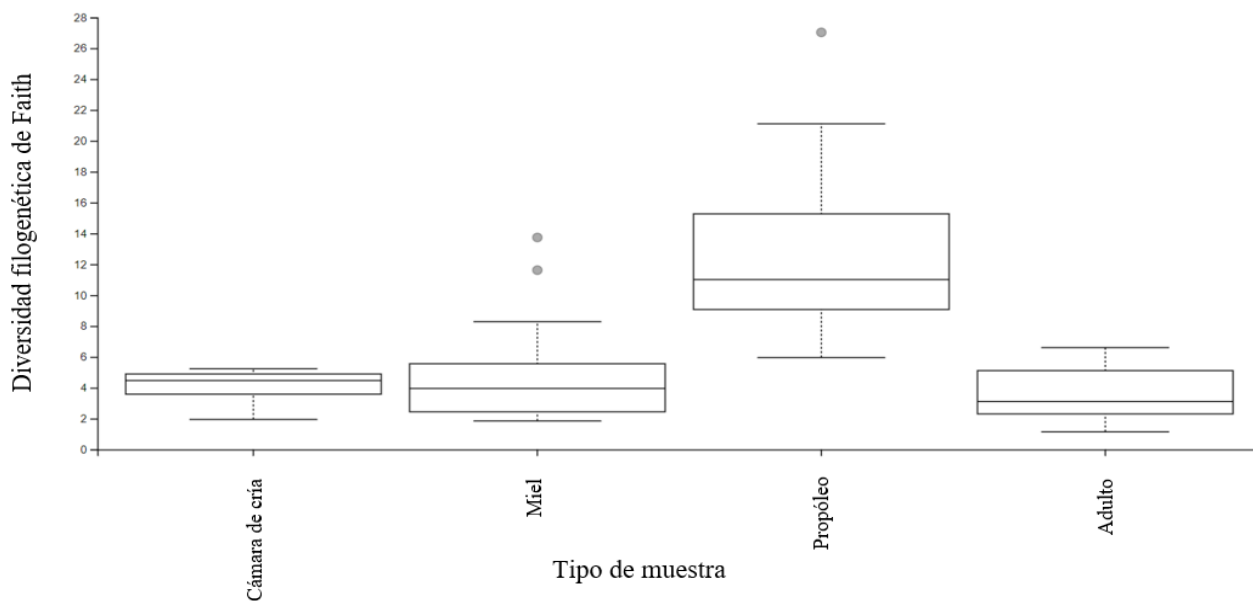


Figura 9. Diagrama de cajas de la diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

Las diferencias no son estadísticamente significativas en el diagrama de cajas de diversidad filogenética de Faith al comparar las muestras según la especie de abeja sin aguijón de las que provienen (Figura 10).

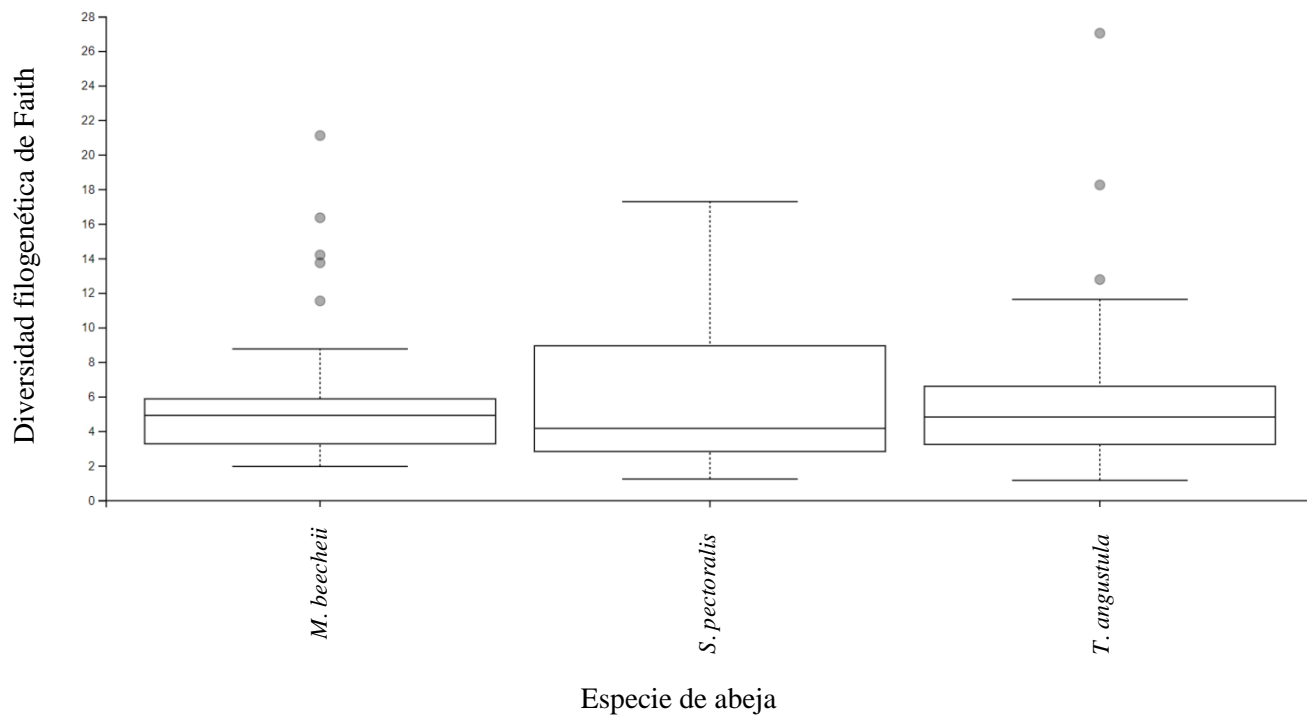


Figura 10. Diagrama de cajas de la diversidad filogenética de Faith para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

Con respecto a la riqueza de especies microbianas usando el estimador Chao1, se observa que las muestras de propóleo son las que muestran mayor riqueza, mientras que el resto de muestras no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Figura 11).

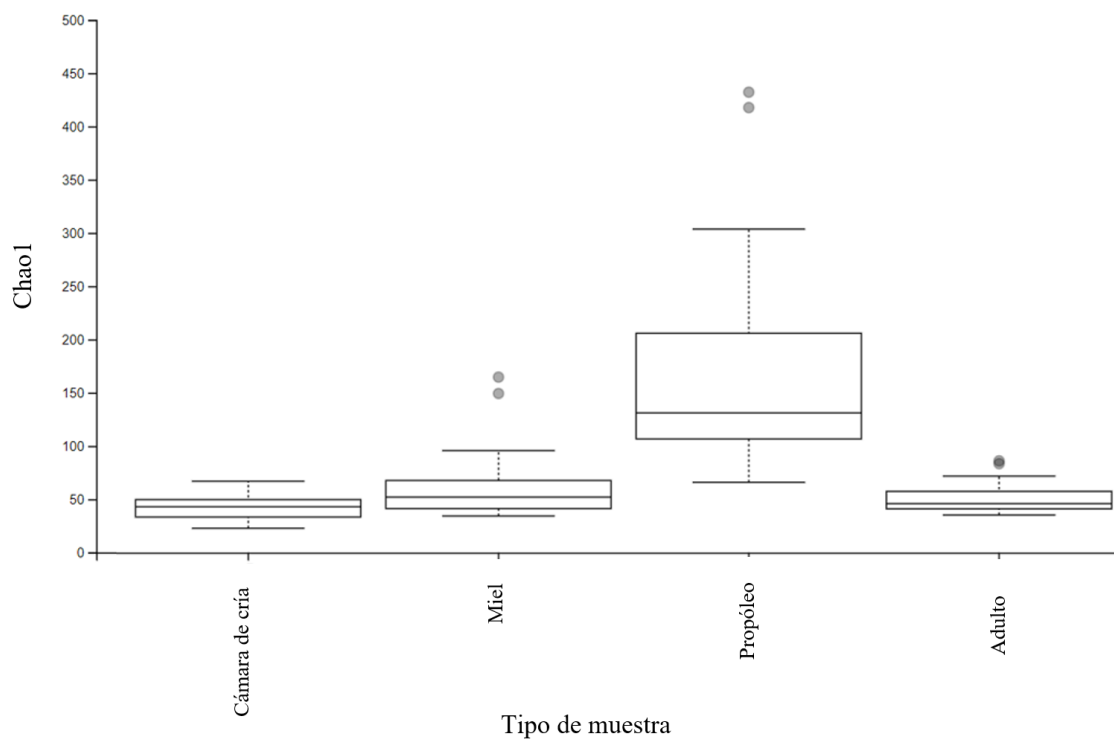


Figura 11. Diagrama de cajas del estimador asintótico de la riqueza de especies microbianas Chao1 para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

El análisis del estimador Chao1 aplicado a cada especie de abeja sin aguijón estudiada muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas en cuanto a riqueza de especies microbiana (Figura 12).

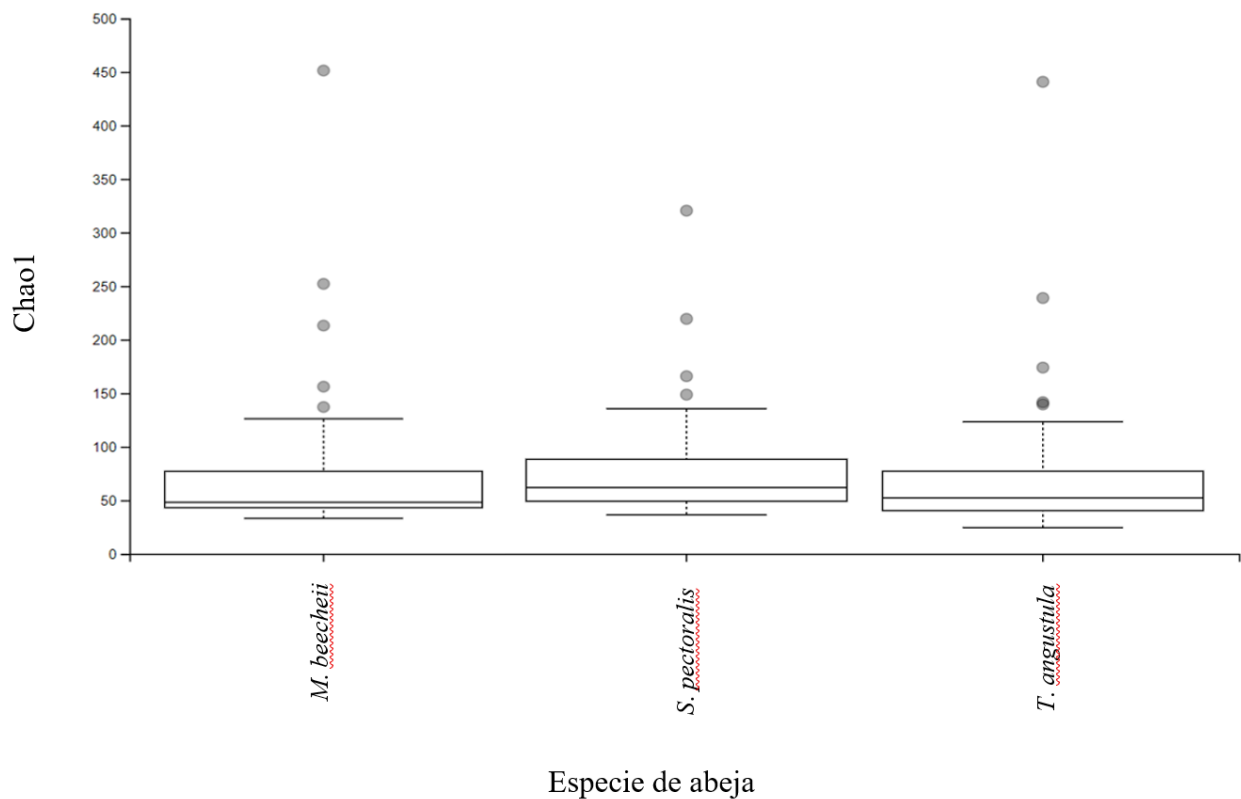


Figura 12. Diagrama de cajas del estimador asintótico de la riqueza de especies microbianas Chao1 para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

Los índices mostrados por el diagrama de cajas de la entropía de Shannon según el tipo de muestra señalan una media de al menos tres en cada una, lo que indica una alta diversidad de especies, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Figura 13).

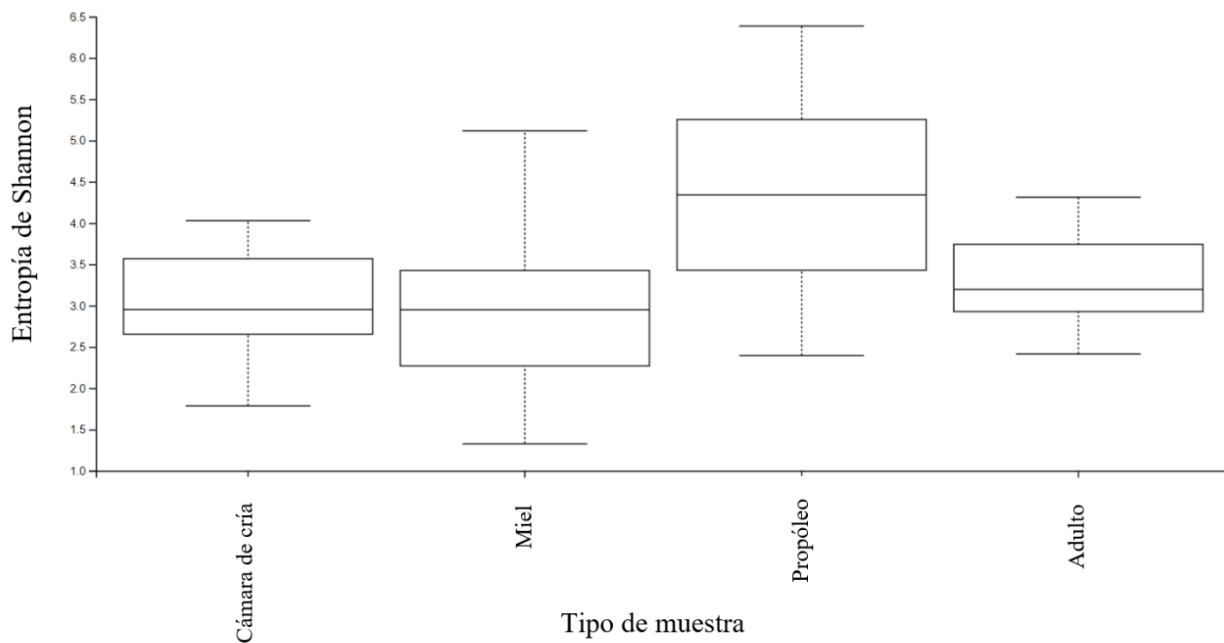


Figura 13. Diagrama de cajas de la entropía de Shannon para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

No obstante, al analizar la entropía de Shannon por especie de procedencia de las muestras, se obtienen diferencias estadísticamente significativas entre la diversidad de especies bacterianas entre *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula* (Figura 14).

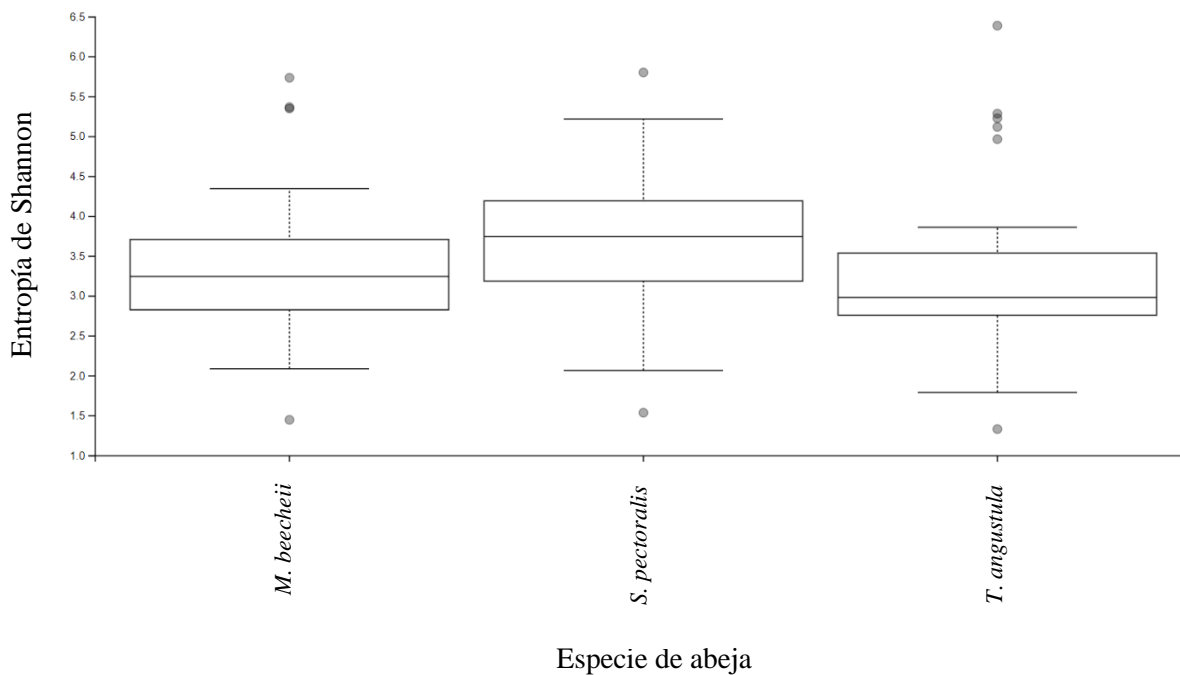


Figura 14. Diagrama de cajas de la entropía de Shannon para la composición bacteriana de los componentes coloniales de *T. angustula*, *S. pectoralis* y *M. beecheii*.

6.4 Mapa de calor

En el mapa de calor se observa la presencia de ciertos OTUs asociados a tipos de muestras específicas e incluso a especies de abejas. De importancia notar que las OTUs de *Zymobacter* 01 y 02 están presentes exclusivamente en muestras de *Tetragonisca angustula*, estando en mayor abundancia en las muestras de miel (Figura 15).



Figura 15. Mapa de calor de la composición bacteriana de los 50 OTU más abundantes asociada a los componentes coloniales de *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii*.

6.5 Aislamiento de *Zymobacter* sp. recuperado de miel de *Tetragonisca angustula*

En el aislamiento de *Zymobacter* sp. se observó el crecimiento de colonias redondas, suaves, opacas y color blanco leche (Figura 16).

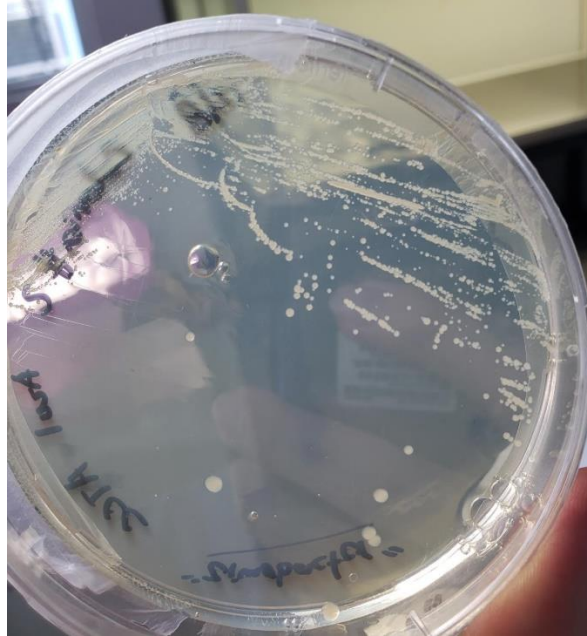


Figura 16. Vista de las colonias de *Zymobacter* sp. creciendo en medio ATCC 1956.

Al realizar la tinción de Gram se observaron bacilos Gramnegativos, concordantes a lo esperado para *Zymobacter* sp. (Figura 17).

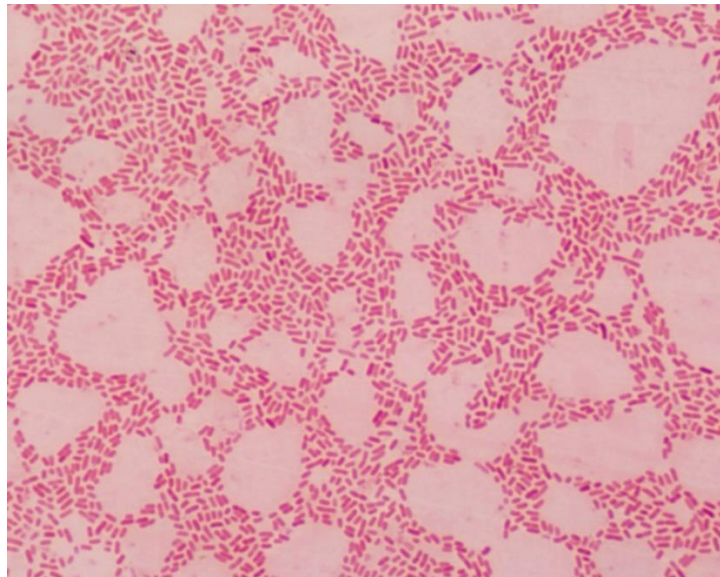


Figura 17. Tinción de Gram de un aislamiento de *Zymobacter* sp.

El árbol filogenético muestra que la secuencia asociada al aislamiento B9667_SID21 se agrupa junto a otros aislamientos del género *Zymobacter*. Aunque parece que se ubica fuera del grupo de *Zymobacter palmae*, también hay una secuencia asociada a *Zymobacter palmae* T109 que está fuera del mismo grupo (Figura 18).

Tree scale: 0.01

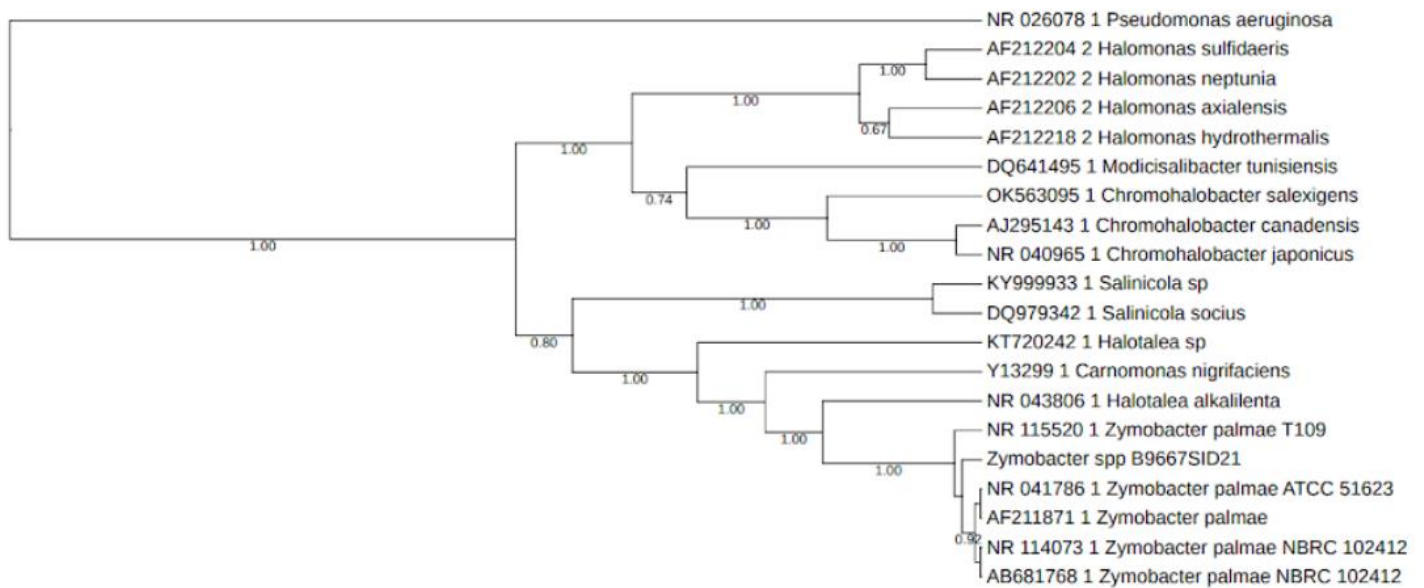


Figura 18. Árbol filogenético basado en el análisis del gen ARNr 16S de distintas cepas de la familia Halomonadaceae, incluyendo la aislada de muestras de miel de *Tetragonisca angustula* (B9667_SID21).

7. Discusión

La miel de abejas sin aguijón ha sido ampliamente estudiada, no obstante, los estudios sobre otros componentes de la colonia son limitados, especialmente en propóleo y cámaras de cría, además, hay pocos estudios sobre su estructura y su composición bacteriana (Tang et al., 2021; Soto, 2021).

Los resultados del microbioma de *Tetragonisca angustula* criadas por meliponicultura en Costa Rica difieren con lo reportado para esta misma especie en otras latitudes. Por ejemplo, en un estudio realizado en Brasil, solo dos de las siete familias bacterianas más abundantes (Sphingomonadaceae y Xanthomonadaceae) reportadas en colonias de *Tetragonisca angustula* fueron obtenidas en las muestras analizadas en este estudio (de Sousa, 2021), lo mismo sucede con la composición microbiana de la miel, no hay especies coincidentes en las mieles analizadas en este estudio con las obtenidas para *Tetragonisca angustula* criadas en Brasil (Beux et al., 2022).

Esto puede deberse al tipo de flora propia de la región al que se exponen las abejas en Costa Rica, ya que la composición del microbioma colonial depende tanto de las características físicas, químicas, estructurales y fisiológicas de cada especie, como de los ecosistemas, el genotipo del hospedero y la flora de la que se alimenta o forrajea (Huang y Zhang, 2013). Esto, aunado al hecho de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los análisis de beta diversidad realizados en este estudio entre las tres especies de melipónidos, refuerza el hecho de que esta composición microbiana depende más del ecosistema que les rodea que de las diferencias genéticas entre las abejas.

En cuanto a las abundancias del microbioma asociado a las especies de abejas analizadas, se observó que todas las muestras poseen una diversidad y riqueza similar, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas, excepto por las muestras de propóleo, las cuales tienen una mayor riqueza y diversidad. Consistentemente, las muestras de propóleo son las que más difieren en composición microbiana con respecto a otros tipos de muestra sin importar de qué tipo de abeja provengan (Figura 9), remarcando la necesidad de realizar más estudios en este componente de la colonia, ya que por la riqueza de especies

que posee podría ser fuente de nuevos microorganismos y biomoléculas de interés industrial, por su capacidad de crecer en un medio químicamente hostil.

En este trabajo se observa cómo es el propóleo en donde hay mayor riqueza de especies, las cuales tienen poca relación con la composición microbiana del resto de la colonia (Figura 8), pero también se observó que es en muestras de propóleo en donde se encuentran las secuencias más raras en los microbiomas asociados con abejas (Figura 11), asimismo, ninguna de las OTUs más frecuentes en muestras de propóleo aparecen en las más frecuentes de los otros tipos de muestra, siendo la única muestra en la que esto sucede (Figura 15).

Se ha sugerido que el propóleo puede cumplir la función de mantener una composición estable en la comunidad microbiana de las abejas, además de que reduce la diversidad taxonómica general del microbioma de la abeja, sin embargo, en ausencia de propóleo, algunas especies relevantes de la microbiota de estas abejas se alteraron significativamente, lo que sugiere que puede desempeñar un papel importante en el mantenimiento de una abundancia y composición favorables de los simbiositos (Saelao et al., 2020).

Se sabe poco acerca de cómo el propóleo puede interactuar con los simbiositos microbianos asociados con las abejas y si el propóleo altera la estructura de la comunidad microbiana, pero los hallazgos obtenidos por Saelao y colaboradores (2020) sugieren que el propóleo puede ayudar a mantener la salud microbiana de la colonia de abejas al limitar los cambios en la comunidad microbiana en general. No obstante, hacen falta más estudios para poder determinar si esto lo logra por la inhibición química de las especies más abundantes o si es más bien la interacción con los microorganismos raros que sobreviven en el propóleo lo que limita el sobrecrecimiento de las bacterias predominantes y limitan las oportunidades de proliferar para organismos ajenos a la colonia.

En este estudio se evidenció la abundancia de *Lactobacillus* spp. en las muestras analizadas (Figura 4), este género de bacterias tolera medios ácidos y procesa azúcares, por lo que se espera encontrarlo en el néctar y el polen que se asocia con el alimento de abejas adultas, pero no de las larvas (Mohr y Tebbe, 2006; Olofsson y Vásquez, 2008). Una de las propiedades que se conocen de las bacterias ácido lácticas es su participación en la producción de miel y la fermentación del polen, además, *Lactobacillus* spp. también son

conocidos por su capacidad de inhibir patógenos y conservar alimentos, por lo que su elevada presencia indica que podrían estar cumpliendo un papel importante en la salud y nutrición de la colonia (Vásquez et al., 2012).

En las muestras de propóleo, se observó una disminución en los porcentajes de abundancia correspondientes al género *Lactobacillus*, esto se debe a la capacidad del propóleo de inhibir algunas especies de este género, en este aspecto, los flavonoides, ácidos aromáticos, diterpenoides y compuestos fenólicos se han identificado como las moléculas orgánicas responsables de las propiedades antimicrobianas (Bucio-Villalobos y Martínez-Jaime, 2017).

Si bien no hay diferencias estadísticamente significativas entre el microbioma de estas tres abejas sin aguijón, se observó que dos de las 50 OTU más abundantes en las muestras, las cuales corresponden a *Zymobacter* sp., solo se identificaron en muestras de *Tetragonisca angustula* (Figura 15), lo que parece indicar que existe una asociación exclusiva entre ambas especies.

Estudios previos sugieren que esta bacteria tiene la capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcar, gracias a su capacidad de producir glicina-betaína, y de catabolizar azúcares presentes en la miel, lo que le permitiría metabolizar el polen para obtener energía a la vez que le provee nutrientes a las abejas. También, gracias a su capacidad de fermentar manosas, podría proteger a *Tetragonisca angustula* de sustancias tóxicas presentes en el polen, además, posee enzimas que tienen actividad biológica contra bacterias y sus biopelículas, como alfa glucosidasas y quitina deacetilasa, lo cual podría funcionarle a la abeja como factor protector contra patógenos (Viquez, 2022). No obstante, hace falta realizar más estudios para poder determinar el tipo de interacción biológica que hay entre *Zymobacter* y *Tetragonisca angustula*.

Existen otras diferencias en la composición del microbioma entre estas tres especies de abejas, por ejemplo, *Tyzzarella* sp. tiene presencia en muestras de *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula*, pero es escasa en muestras de *Scaptotrigona pectoralis*, *Erysipelatoclostridium* sp. es más frecuente en muestras de *Tetragonisca angustula*, *Stenotrophomonas* sp. fue encontrado únicamente en muestras de *Tetragonisca angustula*, *Streptococcus* sp. no fue observado solo en muestras provenientes de *Tetragonisca*

angustula, entre otras, pero se requieren estudios más profundos para poder identificar no solo las causas de estas diferencias sino también las funciones que podrían estar cumpliendo dichas especies en el microbioma de las abejas, ya que los estudios sobre estas bacterias en abejas son nulos o escasos.

En este estudio, las colonias recuperadas de *Zymobacter* sp. cumplieron con las características coloniales (Figura 16) y de Gram (Figura 17) esperadas para *Zymobacter* sp., además, fueron aisladas de muestras de miel de *Tetragonisca angustula* (Figura 15), componente donde se detectó principalmente en los análisis independientes de cultivo. Este hallazgo podría indicar algún tipo de diferencia genética con *Zymobacter palmae*, la única especie descrita para el género hasta la fecha, gracias a la adaptación de la maquinaria celular para la supervivencia en la miel.

Al realizar los análisis filogenéticos a partir del gen que codifica para el ARNr 16S, se observó que el aislamiento recuperado quedó fuera del grupo de *Zymobacter palmae*, pero cercano a una cepa de *Zymobacter palmae* que también se encuentra fuera del mismo grupo. Cabe destacar que estudios basados en el análisis del gen ARNr 16S no son suficientes para identificar un microorganismo a nivel de especie, para esto se requiere de los valores de índices nucleotídicos promedio y apoyarlo con análisis de secuencias de multilocus o realizar una secuenciación de genoma completo para determinar distancias filogenéticas por comparación de genomas, entre otras estrategias genómicas no realizadas en este trabajo (Kim et al., 2014; Chun y Rainey, 2014). Por lo tanto, queda pendiente esta identificación para posteriores estudios. Lo que sí se puede afirmar con este análisis es que el aislamiento obtenido corresponde a una bacteria del género *Zymobacter*.

Zymobacter palmae sigue siendo el único representante del género hasta la fecha, por lo que no se descarta la posibilidad de que existan nuevas especies simbiotas asociadas con las abejas sin aguijón, debido a las adaptaciones de las bacterias de este género, por lo que se recomienda obtener más aislamientos de *Zymobacter* sp. de mieles de abejas para determinar si existe otra especie dentro de este género, la cual, además, podría ser usada con fines biotecnológicos.

8. Conclusiones

8.1 Descripción del microbioma asociado a cámaras de cría, miel, propóleo y adultos de *Tetragonisca angustula* y comparación con otras dos especies de meliponas de la misma región geográfica

- La composición del microbioma asociado a las distintas especies de abejas es similar debido al comportamiento social y cercanía geográfica de estas especies.
- Los modelos estadísticos utilizado para analizar la alfa y beta diversidad demostraron que estos parámetros junto con los valores de riqueza, no difieren estadísticamente entre las tres especies de abejas sin aguijón.
- Aún así, en todos los modelos, el componente colonial que presentó mayor riqueza y diversidad de especies bacterianas independientemente de la especie de la que proviniera fue el propóleo.
- Se requieren estudios adicionales para conocer la función de la mayoría de las bacterias del microbioma de las abejas, sus relaciones ecológicas y su papel en la naturaleza.
- *Lactobacillus* spp. presenta alta abundancia en las muestras, excepto las de propóleo.

8.2 Aislar y describir morfológicamente colonias de *Zymobacter* sp. recuperadas de muestras de miel de *Tetragonisca angustula*

- Se recuperaron colonias redondas, suaves, opacas y color blanco leche concordantes con lo esperado para *Zymobacter* sp. de muestras de miel de *Tetragonisca angustula*.
- La tinción de Gram mostró bacilos Gramnegativos concordantes con *Zymobacter* sp.

8.3 Confirmar la clasificación taxonómica dentro la familia Halomonadaceae y del género *Zymobacter* de las colonias sospechosas aisladas a partir de miel de *Tetragonisca angustula*

- El aislamiento obtenido correspondió a una especie del género *Zymobacter*.
- Se requieren más estudios para definir si el aislamiento corresponde a una nueva especie dentro del género.

9. Bibliografía

- Aguilar, I., Herrera, E., y Zamora, G. (2012). Stingless bees of Costa Rica. In *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 113-124). New York, NY: Springer New York.
- Aguilera-Peralta, F. J., y Ferrufino-Arnéz, U. (2004). Cómo criar abejas melíferas sin aguijón. *Asociación Ecológica del Oriente (ASEO), Unión Mundial para la Naturaleza (UICN)*.
- Baker, G. C., Smith, J. J., y Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.
- Barquero-Elizondo, A. I., Aguilar-Monge, I., Méndez-Cartín, A. L., Hernández-Sánchez, G., Sánchez-Toruño, H., Montero-Flores, W., ... y Bullé-Bueno, F. (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.
- Beux, M. R., Ávila, S., Surek, M., Bordin, K., Leobet, J., Barbieri, F., ... & Rosa, E. A. R. (2022). Microbial biodiversity in honey and pollen pots produced by *Tetragonisca angustula* (Jataí). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 65, e22210440.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- Bracho J. (2000). Constituyentes volátiles de propóleo: realidad acerca de su rica composición química. *Boletín de la Sociedad Química del Perú*, 4, 198-209.
- Brudzynski, K. y Sjaarda, C. (2015). Honey glycoproteins containing antimicrobial peptides, jelleins of the major royal jelly protein 1, are responsible for the cell wall lytic and bactericidal activities of honey. *PLOS ONE*, 10(4), e0120238. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0120238>
- Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
- Burdock G. A. (1997). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 36, 347-363.
- Camargo, J. M., y Moure, J. S. (1983). Trichotrigona, um novo gênero de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), do rio Negro, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 13, 421-429.
- Carrasco, L. (2010). Métodos de estudio de los cambios estructurales en ecosistemas microbianos edáficos y su aplicación ambiental. *Ciencia al Día Internacional*, 5, 1-240

- Carvajal, V. (2020). Importancia de las abejas como polinizadores. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/21021/1/Importancia%20de%20las%20abejas%20como%20polinizadores2a.pdf>
- Chun, J. y Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 316-324.
- Cooper, R. (2016). Honey for wound care in the 21st century. *Journal of Wound Care*, 25(9), 544–552. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.9.544>
- de la Haba, R. R. (2010). Filogenia de la familia halomonadaceae basada en el análisis por secuenciación multilócica (mlsa) (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).
- de Sousa, L. P. (2021). Bacterial communities of indoor surface of stingless bee nests. *PLoS One*, 16(7), e0252933.
- Dobson, S. J., y Franzmann, P. D. (1996). Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 550–558.
- Dolezal, M., Dolezal, M., Medrelá-Kuder, E. (1988). Research on inhibine effect of herb-honey. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 30: 9-16.
- Douglas, A. E. (2014). Symbiosis as a General Principle in Eukaryotic Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(a016113), 1–12.
- Dostert, M., Trimble, M. y Hancock, R. (2021). Antibiofilm peptides: overcoming biofilm-related treatment failure. *RSC Advances*, 11, 2718-2728.
- Engel, P., y Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Escribano, A. V. (2016). *Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano* (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE).
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., ... y Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, 15(5), 645-656.
- Figuroa-Mata, G., Prendas-Rojas, J. P., Ramírez-Bogantes, M., Aguilar-Monge, I., Herrera-González, E., y Travieso-González, C. M. (2016). Identificación de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) a partir de la clasificación de los descriptores SIFT de una imagen del ala derecha anterior. *Revista Tecnología en Marcha*, 29, 51-63.
- Fletcher, M. T., Hungerford, N. L., Webber, D., Carpinelli de Jesus, M., Zhang, J., Stone, I. S. J., ... Zawawi, N. (2020). Stingless bee honey, a novel source of trehalulose: a biologically active

disaccharide with health benefits. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68940-0>

- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., and Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2461–2470. doi: 10.1128/AEM.02272-07
- Frankie, G. W., Coville, R. E., Pawele, J. C., Jadallah, C. C., Vinson, S. B., y Martínez, L. E. S. (2018). Bee-Flower-People Relationships, Field Biologists, and Conservation in Northwest Urban Costa Rica and Beyond. *Zoosymposia*, 12, 18-28.
- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., y Brown, M. J. F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506(7488), 364–366. <https://doi.org/10.1038/nature12977>
- Gerardo, N. M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S. M., De Vos, M., ... y Vilcinskis, A. (2010). Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome biology*, 11(2), 1-17.
- Gerpe, D. (2019). *Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (Ruditapes decussatus) y almeja japonesa (Ruditapes philippinarum) mediante técnicas de secuenciación masiva* (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).
- Gonnet, M. (1986). L'analyse des miels. Description de quelques méthodes de contrôle de la qualité. *Bulletin Technique Apicole*, 13(1), 17–36.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., y Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Guachamin-Rosero, A. M. (2020). *Entomofagia en dos comunidades Kichwa, provincia de Napo, Amazonía del Ecuador* (Doctoral dissertation, URAI).
- Hamana, K., Sakane T., y Yokota, A. (1994). Polyamine analysis of the genera, *Aquaspirillum*, *Magnetospirillum*, *Oceanospirillum* and *Spirillum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 40: 75–82
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., ... y Cherif, A. (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of applied entomology*, 135(7), 524-533.
- Horn, S. J., Aasen, I. M., y Østgaard, K. (2000). Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 51–57. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900771>
- Huang, S., & Zhang, H. (2013). The Impact of Environmental Heterogeneity and Life Stage on the Hindgut Microbiota of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057169>

- Kačániová, M., Chlebo, R., Kopernický, M., y Trakovická, A. A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia microbiologica*, 49(2), 169-171.
- Kameoka, S., Motooka, D., Watanabe, S. *et al.* Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics* 22, 527 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07746-4>
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., y Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt_2), 346-351.
- Kozich, J., Westcott, S., Baxter, N., Highlander, S., Schloss, P. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120.
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., y 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.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., y Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Linder, K. E. (1962). Ein Beitrag zur Frage der antimikrobiellen Wirkung der Naturhonige. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene*, 115(7): 720-736.
- Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., & Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic acids research*, 36(18), e120-e120.
- Luque, I. D., Marqués, M. C., Valls, G. E. M., y de Antonio, E. M. (2017). Aplicaciones de la secuenciación de nueva generación en el estudio del virus del PRRS. *Suis*, (143), 8-12.
- Martínez, J., Fajardo, M., Pérez, J. (2005). Obtención de Tintura de Propóleos en las Plantas de Productos Naturales. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. 36.
- Mavric, E., Wittmann, S., Barth, G., y Henle, T. (2008). Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular Nutrition y Food Research*, 52(4), 483–489. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700282>
- Mejía-Torres, M. C. (2020). *Relación del estado de deterioro de colonias de abejas meliponinas Tetragonisca angustula (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) con los microorganismos asociados* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Michener, C. D. (2012). The Meliponini. *Pot-Honey*, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_1

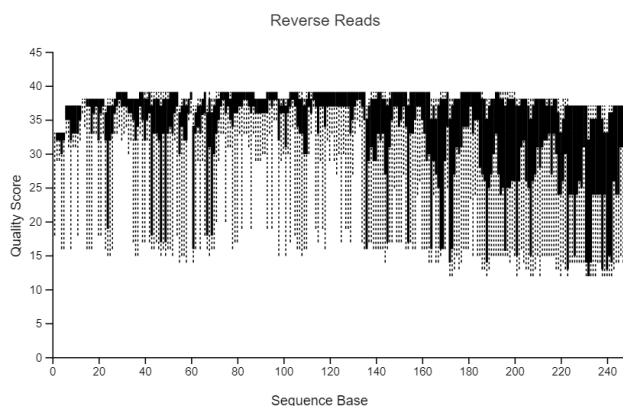
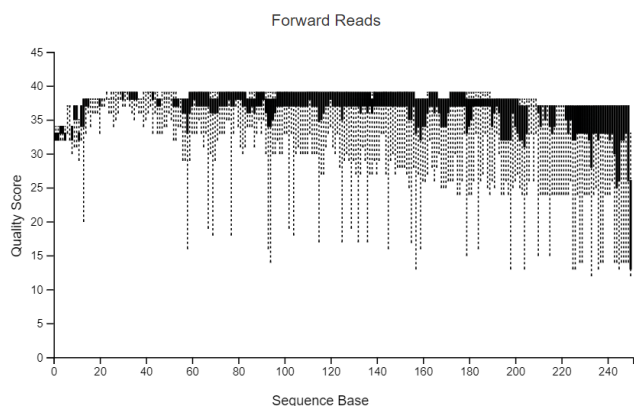
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1994). *Apicultura: Estrategias para el manejo adecuado de las colmenas*. Memorias del tercer congreso nacional de apicultura. Editorial: Departamento publicaciones agrícolas.
- Mohr, K. y Tebbe, C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8, 258-272.
- Molan, P. C. (1992). The Antibacterial Activity of Honey. *Bee World*, 73(1), 5–28. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1992.11099109>
- Molan, P. C. y Russell, K. M. (1988). Non-Peroxide Antibacterial Activity in Some New Zealand Honeys. *Journal of Apicultural Research*, 27(1), 62–67. <https://doi.org/10.1080/00218839.1988.11100783>
- Moran, N. A., Degnan, P. H., Santos, S. R., Dunbar, H. E., y Ochman, H. (2005). The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 16919-16926.
- Nates-Parra, G. (1996). *Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponinae) de Colombia*. Págs. 181-268 en: Amat, G., G. Andrade y F. Fernandez. *Insectos de Colombia: Estudios escogidos*.
- Nates-Parra, G. (2001). *Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia*. *Biota Colombiana*, 2(3), 233-248.
- Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. In *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão* (pp. 446-446).
- Núñez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerdá, J., y Lecuit, M. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(3), 844-850.
- Okamoto, T., Kuraishi, H., y Yamasato, K. (2015). *Zymobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01191>
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi H. y Yamasato, K. (1993). *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch. Microbiol.*, 160: 333 – 337.
- Olofsson, T. C., y 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(4), 356–363. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. (2018, mayo 17). *Es hora de apreciar la labor de los polinizadores*. <https://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1129811/>
- Palomino-Camargo, C. y González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535-546.

- 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. *Sci Rep* 8: 1122.
- Parra, G. y Londoño, J. (2013). Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia. *Acta biológica colombiana*, 18(3), 415-426.
- 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>
- QIIME 2. (30 de septiembre, 2021). *Overview of QIIME 2 Plugin Workflows*. <https://docs.qiime2.org/2022.2/tutorials/overview/>
- Qin, Q. L., Xie, B. B., Zhang, X. Y., Chen, X. L., Zhou, B. C., Zhou, J., ... y Zhang, Y. Z. (2014). A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. *Journal of bacteriology*, 196(12), 2210-2215.
- Quezada, J. (2005). *Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México: hymenoptera: meliponini*. Universidad Autónoma de Yucatán, Dirección General de Desarrollo Académico, Coordinación General de Extensión, Departamento Editorial.
- Raj, K. C., Talarico, L. A., Ingram, L. O., y Maupin-Furlow, J. A. (2002). Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene (PDC) and comparison to bacterial homologues. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2869– 2876.
- Rodrigues, A. A. (2018). Diversidade e prospecção de rizobactérias associadas à cana-de-açúcar sob manejo orgânico: metodologias clássicas e moleculares a serviço da agroecologia.
- Rodríguez-Pérez, B., Canales-Martínez, M. M., Penieres-Carrillo, J. G., y Cruz-Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta universitaria*, 30.
- Rodríguez, P. A., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología cosmética, médica y quirúrgica*, 16(2), 166-167.
- Rodriguez-R, L. M. y Konstantinidis, K. T. (2014). Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe*, 9(3), 111-118.
- Rosso-Londoño, J. M. y Nates-Parra, G. (2005). Meliponicultura: una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. *Leisa Revista de Agroecología*, 14– 16.
- Roubik, W. (1989). *Ecology and Natural History of tropical bees*. Cambridge University Press.
- Roubik D. (1982). Obligate necrophagy in a social bee. *Science*. (217), 1059-1060.
- Saelao, P., Borba, R. S., Ricigliano, V., Spivak, M., & Simone-Finstrom, M. (2020). Honeybee microbiome is stabilized in the presence of propolis. *Biology letters*, 16(5), 20200003.

- Santillán-Garzón, S., Diego Álvarez, D., Buades, C., Romera-López, A., Pérez-Cabornero, L., Valero-Hervás, D., ... y Ballester, A. (2015). Diagnóstico molecular de enfermedades genéticas: del diagnóstico genético al diagnóstico genómico con la secuenciación masiva. *Rev. Méd. Clín. Condes*, 458-469.
- Shanks, J. L. (2015). *Tetragonula carbonaria* and disease: Behavioural and antimicrobial defences used by colonies to limit brood pathogens (Doctoral dissertation, University of Western Sydney (Australia)).
- Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., y Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2), 293-315.
- Soto, J. (2021). Determinación de la capacidad antioxidante de la miel producida por *Tetragonisca angustula*, procedente de los productores asociados a la red de meliponicultores de "Alianza Campesina Flora Nueva". [Tesis para optar por el título de Maestría]. Universidad Nacional.
- Spagarino, C., Chianetta, P., y Basilio, A. M. (2014). Especies arbóreas utilizadas por abejas meliponas (Apidae: Meliponini) en el bosque chaqueño semiárido en Formosa (Argentina). *Agronomía y Ambiente*, 34(1-2).
- Stackebrandt, E. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, 33, 152-155.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), pp.3-9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Tang, Q. H., Miao, C. H., Chen, Y. F., Dong, Z. X., Cao, Z., Liao, S. Q., Wang, J. X., Wang, Z. W., & Guo, J. (2021). The composition of bacteria in gut and beebread of stingless bees (Apidae: Meliponini) from tropics Yunnan, China. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(8), 1293–1305. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01602-x>
- Vallejo, M. A. (2020). *Microorganismos cultivables asociados a los estadios y edades de Trigona (Tetragonisca) angustula Latreille (Hymenoptera: Meliponini)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE*, 7(3), 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>
- Vázquez, A. (2016). *Técnicas de secuenciación de nueva generación para el estudio del microbioma humano* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense).
- Větrovský, T., y Baldrian, P. (2013). The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, 8(2), e57923.
- Viquez, F. (2022). *Bacterias de la familia Halomonadaceae asociadas a la miel de la especie de abejas sin aguijón Tetragonisca angustula (Apidae: Meliponini)*. [Tesis para optar por el grado de licenciatura]. Universidad de Costa Rica.

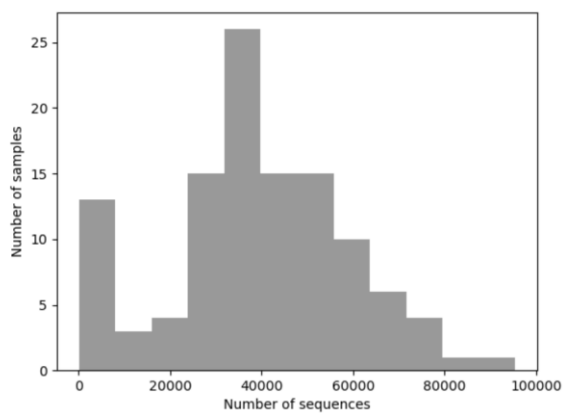
- White, J. W., Subers, M. H., Schepartz, A. I. (1963). The identification of the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 73: 57-70.
- Whittaker, R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou mountains, Oregon and California. *Ecological monographs*, 30(3), 279-338.
- Wille, A. (1983). Biology of the stingless bees. *Annual review of entomology*, 28(1), 41-64.
- Zulkhairi Amin, F. A., Sabri, S., Mohammad, S. M., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., ... Zawawi, N. (2018). Therapeutic Properties of Stingless Bee Honey in Comparison with European Bee Honey. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2018/6179596>
- Zamora, L. G. (2018). *Characterization of Bioactive Constituents from Honey Produced by Costa Rican Stingless Bees*. Utrecht University.
- Zamora, L. y Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista biomédica*, 22(2), 59-66.
- Zamora, L., Arias, M., Aguilar, I., Umaña, E. (2013). *Costa Rican pot-honey: its medicinal use and antibacterial effect*. In P. Vit, S.R.M. Pedro y D.W. Roubik (Eds.), *Pot- Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 507-512). New York: Springer. DOI: 10.1007/978-1-4614-4960-7_37
- Zamora, L., Beukelman, K., van den Berg, B., Arias Maria, L., Umana, E., Aguilar, I., ~ ... Gross, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 503–513. doi:10.3896/IBRA.1.53.5.04

10. Anexos

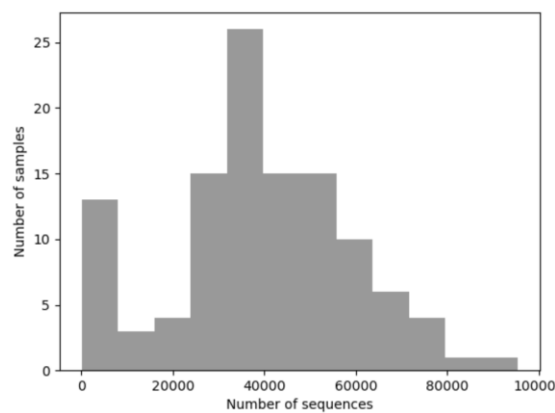


Anexo 1. Puntajes de calidad de los cebadores utilizados en la secuenciación del ARNr 16S.

Forward Reads Frequency Histogram



Reverse Reads Frequency Histogram



Anexo 2. Cantidad de *reads* obtenidos por muestra por cada cebador durante la secuenciación del ARNr 16S.

Tabla 1. Datos estadísticos representados gráficamente en el histograma anterior.

	forward reads	reverse reads
Minimum	70	70
Median	37532	37532
Mean	38699.3	38699.3
Maximum	95459	95459
Total	4373023	4373023

Tabla 2. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para estimador asintótico de la riqueza de especies microbianas Chao1.

Kruskal-Wallis (all groups)

Result	
H	34.79173063401519
p-value	1.348139904652754e-7

Kruskal-Wallis (pairwise)

[Download CSV](#)

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Melipona beecheii (n=27)	NA (n=12)	24.332016	8.108019e-07	1.621604e-06
	Scaptotrigona pectoralis (n=32)	2.701342	1.002638e-01	1.203196e-01
	Tetragonisca angustula (n=42)	0.016653	8.972295e-01	8.972295e-01
NA (n=12)	Scaptotrigona pectoralis (n=32)	25.610860	4.157384e-07	1.247215e-06
	Tetragonisca angustula (n=42)	27.513982	1.556629e-07	9.357776e-07
Scaptotrigona pectoralis (n=32)	Tetragonisca angustula (n=42)	2.751658	9.715364e-02	1.203196e-01

Tabla 3. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la diversidad filogenética de Faith.

Kruskal-Wallis (all groups)

Result	
H	50.10130513346434
p-value	7.601984184059039e-11

Kruskal-Wallis (pairwise)

[Download CSV](#)

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
brood_comb (n=25)	honey (n=26)	0.051124	8.211184e-01	8.211184e-01
	propolis (n=23)	35.204082	2.969006e-09	8.907019e-09
	worker_bee (n=27)	2.452075	1.173696e-01	1.760544e-01
honey (n=26)	propolis (n=23)	28.183946	1.103158e-07	2.206315e-07
	worker_bee (n=27)	1.139601	2.857366e-01	3.428839e-01
propolis (n=23)	worker_bee (n=27)	35.826939	2.156454e-09	8.907019e-09

Tabla 4. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para la entropía de Shannon.

Kruskal-Wallis (all groups)

Result	
H	5.263999631755894
p-value	0.07193440261987617

Kruskal-Wallis (pairwise)

[Download CSV](#)

Group 1	Group 2	H	p-value	q-value
Melipona beecheii (n=27)	Scaptotrigona pectoralis (n=32)	1.959259	0.161593	0.242389
	Tetragonisca angustula (n=42)	0.673167	0.350080	0.350080
Scaptotrigona pectoralis (n=32)	Tetragonisca angustula (n=42)	4.809643	0.028301	0.084903

