

# Abejas nativas sin aguijón en Tumbes, Perú: Caracterización genómica y comunidad bacteriana

## Native stingless bees in Tumbes, Peru: Genomic characterization and bacterial community

Milton Valladolid R.<sup>1,\*</sup>; Henry W. Chapoñan D.<sup>1,\*</sup>; Ramón García-Seminario<sup>1</sup>; Pedro G. Labán L.<sup>1</sup>; Néstor Díaz C.<sup>1</sup>; Carlos A. Deza N.<sup>1</sup>; Miguel A. Garrido R.<sup>1</sup>; Dicson Sánchez A.<sup>2</sup>; Jorge Zapata O.<sup>2</sup>; Eric Louis Mialhe<sup>2</sup>

1 Universidad Nacional de Tumbes. Perú.  
2 INCA BIOTEC S.A.C, Tumbes, Perú.

\*Autor correspondiente: [mvalloa01@gmail.com](mailto:mvalloa01@gmail.com) (M. Valladolid R.); [echai5001@gmail.com](mailto:echai5001@gmail.com) (H. Chapoñan D.)

ID ORCID de los autores

M. Valladolid R.: <http://orcid.org/0000-0002-0526-0544>

R. García-Seminario: <http://orcid.org/0000-0003-0756-0935>

N. Díaz C.: <http://orcid.org/0000-0003-3808-5954>

M. A. Garrido R.: <http://orcid.org/0000-0002-8542-9353>

J. Zapata O.: <http://orcid.org/0000-0002-4560-8234>

H. W. Chapoñan D.: <http://orcid.org/0000-0002-4049-3466>

Pedro G. Labán L.: <http://orcid.org/0000-0002-8107-1534>

C. A. Deza N.: <http://orcid.org/0000-0002-3324-3741>

D. Sánchez A.: <http://orcid.org/0000-0001-9397-9024>

E. Louis Mialhe: <http://orcid.org/0000-0002-7952-6907>

### RESUMEN

"Abejas nativas sin aguijón" se encuentran en bosques secos de la Reserva de Biosfera del Noroeste Amotapes Manglares, Tumbes, Perú, y poblaciones rurales cercanas. Estas abejas cumplen un rol importante como polinizadoras de cultivos agrícolas, forestales y como proveedoras de miel y polen", siendo *Melipona mimética* la especie más importante. Los objetivos del estudio fueron: la identificación molecular usando tres loci genéticos distintos (Citocromo c oxidasa, 28S ribosomal RNA y gen 16S rRNA), la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y análisis bioinformático, identificándose a los géneros: *Cephalotrigona* sp., *Geotrigona* sp., *Lestrimelitta* sp., *Melipona* sp., *Nannotrigona* sp., *Oxytrigona* sp., *Plebeia* sp., *Scaptotrigona* sp., *Trigona* sp. y *Trigonisca* sp. Y haciendo uso de Metagenómica y secuencias cortas del gen 16s DNAr, comprobado en NCBI, se encontró a especies bacterianas en: huevos 139, larvas 31, pupas 154 y adultos 39, siendo las más importantes *Clostridium* spp., *Lactobacillus camelliae*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus paracollinoides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Pediococcus acidilactici*, y a través de técnicas dependiente e independiente de medios de cultivo a: *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* en larva, *Paenibacillus xylanilyticus* en pupa y adulto: *Humibacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter nectaris* y *Fructobacillus* sp. La identificación genómica y comunidad bacteriana es relevante, por tratarse del primer estudio de estas especies en Perú.

**Palabras clave:** ADNr; PCR; microbiota; *Melipona mimética*; polinizadores

### ABSTRACT

"Native stingless bees" are found in dry forests of the Northwest Amotapes Biosphere Reserve Mangroves, Tumbes, Peru, and nearby rural populations. These bees play an important role as pollinators of agricultural and forest crops and as suppliers of honey and pollen", *Melipona mimética* being the most important species. The objectives of the study were: molecular identification using three different genetic loci (Cytochrome c oxidase, 28S ribosomal RNA and 16S rRNA gene), Polymerase Chain Reaction (PCR) and bioinformatic analysis, identifying with the genres: *Cephalotrigona* sp., *Geotrigona* sp., *Lestrimelitta* sp., *Melipona* sp., *Nannotrigona* sp., *Oxytrigona* sp., *Plebeia* sp., *Scaptotrigona* sp., *Trigona* sp. y *Trigonisca* sp. And making use of Metagenomics and *Clostridium* spp., *Lactobacillus camelliae*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus paracollinoides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Pediococcus acidilactici*, short sequences of the 16S DNAr gene, verified in NCBI, bacterial species were found: in eggs 139, larvae 31, pupae 154 and adults 39, being the most important *Clostridium* spp., *Lactobacillus camelliae*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus manihotivorans*, *Lactobacillus paracollinoides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus suebicus*, *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus vaginalis*, *Pediococcus acidilactici* and through media-dependent and media-independent techniques to: *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* in larva, *Paenibacillus xylanilyticus* in pupa and adult: *Humibacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter nectaris* and *Fructobacillus* sp. The genomic identification and bacterial community are relevant, as it is the first study of these species in Peru.

**Keywords:** rDNA; PCR; microbiota; *Melipona mimética*; pollinators.

Recibido: 11-02-2022.  
Aceptado: 03-06-2022.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

## INTRODUCCIÓN

Las “abejas sin aguijón” constituyen un grupo de abejas melíferas que se encuentran localizadas en los diversos ecosistemas del mundo. La mayor diversidad de especies estimadas se distribuye en el Neotrópico con 400 especies y 33 géneros aproximadamente desde México hasta Argentina (Nates-Parra et al., 2013; Vit et al., 2015; Arnold, et al., 2018). En Ecuador se han identificado las especies; *Scaptotrigona ederi*, *Melipona mimética*, *M. indecisa*, *Paratrigona* aff. y *Nannotrigona* cf., basándose en análisis taxonómicos y morfométricos (Vit et al., 2018).

Las Meliponas en la región de Tumbes, se encuentran dispersas en el bosque seco de la zona Reserva de Biosfera del Noroeste Amotapes-Manglares (RBNAM), así como en las poblaciones rurales cercanas a la reserva. Siendo muy apreciadas por las propiedades terapéuticas de su miel, sin embargo, su situación es muy delicada, debido a la sobreexplotación por parte de la población rural, por lo que debería catalogarse en la lista de especies en estado crítico o vulnerable. En ese contexto, surge la necesidad de realizar estudios concernientes a su identificación, biología y conservación.

Los pocos estudios de identificación que se han

realizado en el Perú a nivel taxonómico de distintas especies de abejas sin aguijón, fueron realizados de características morfológicas por; (Elizalde et al., 2016; Rasmussen et al., 2016; Vásquez-García, et al., 2021), El uso de herramientas moleculares permite caracterizar especies de distintos organismos y sustancias activas de una manera rápida y eficaz (Hebert et al., 2010)

Estudios recientes de diversidad de microbiota intestinal para ser utilizados como estrategias de control, pese a que es un sistema complejo por la relación entre hongos, bacterias y el huésped (en los intestinos de las abejas), (Chanbusarakum et al., 2008). Se comprobó un crecimiento ilimitado de bacterias intestinales en la alimentación de larvas, llegando al 100 % de infección de bacterias, disminuyendo en prepupa, pupa y, aumentando en adulto (Paludo et al., 2019)

La literatura no reporta estudios de identificación de abejas y su microbiota a nivel molecular en el Perú, por lo que esta investigación muestra los primeros antecedentes de una secuencia genómica y los microorganismos bacterianos encontrados a nivel de intestino de estos insectos para programas de desarrollo de una meliponicultura y apicultura sostenible.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Zonas de ejecución y colección de material biológico

Las evaluaciones se realizaron en las poblaciones rurales cercanas a Reserva de Biosfera del Noroeste de Amotapes-Manglares (RBNAM), las muestras fueron obtenidas de las localidades de Rica playa, Pampas de Hospital, Cabuyal, La Angostura, Papayal, Isla Noblecilla y La Totorá, la colecta de abejas se realizó haciendo uso de una red entomológica donde estas realizaban el pecoreo sobre flores y cercanas a la entrada de la colonia (piguera), así como directamente de las cajas racionales de pequeños meliponarios, siendo depositadas en tubos falcón de 50 ml conteniendo buffer twin al 2%, siguiendo protocolos establecidos y luego llevadas, en Criobox con GelPack al Laboratorio de Biología Molecular de la empresa INCA/BIOTEC S.A.C.

### Identificación de *Melipona mimética*

Las muestras se desinfectaron siguiendo el protocolo, el proceso se inició seccionándole la pata trasera para abejas grande, patas y tórax para medianas y cuerpo entero para especímenes pequeños, el procedimiento utilizado fue una modificación al método del acetato de potasio, para las reacciones de PCR se utilizaron primers del gen COI, LCO1490 y HCO2198, del (PM 7/129 (1) DNA., 2016), del gen 28S los primers 28s D2F y 28s D3R, así mismo del gen 16S con los primers 16SWb y 16SWa para preparar el mix usado en PCR con un volumen final de 24 µL, que contenían 19,7 µL de agua libre de nucleasas, 2,5 µL de buffer 10X, 0,5 µL de dNTP's 10mM, 0,6 µL de cada primers: Forward 15µM, Reverse 15µM y 0,1 µL de Taq DNA polymerase 5U/µL; agregándoseles a cada una 1 µL de ADN genómico (Josefsen et al., 2015).

Se utilizó un termociclador TurboCycler 2 de Blue-Ray Biotech para la amplificación, realizándose un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, con un alineamiento a 50 °C por 45 seg, y dos extensiones a 72 °C, una por 1 min y la final por 7 min.

Los productos de PCR se tiñeron con 2 µl de azul de bromofenol + 8 µl del amplicón, estos fueron migrados en gel de agarosa al 1% a 90 Voltios por 25 min y posteriormente se visualizaron bajo luz UV. Posteriormente, se visualizaron en un transiluminador. UV TMW-20

Los amplicones obtenidos en la PCR, fueron secuenciados en la empresa Magrogen-EE.UU. Las secuencias obtenidas, fueron comparadas con la base de datos de GenBank del NCBI (*Basic Local Alignment Search Tool*) para determinar mayor porcentaje de homología.

### Identificación de comunidad bacteriana

Se colectaron muestras de los estados de desarrollo: huevo, larva pupa y adulto, de *M. mimética* de un meliponario ubicado en el distrito de Pampas de Hospital, región Tumbes, se utilizaron bolsas ziploc para llevarlas al laboratorio, en discos de cría conteniendo tubos eppendorf.

### Microbiota intestinal mediante técnicas independientes del medio de cultivo.

Las muestras biológicas fueron congeladas y depositadas por separado en tubos eppendorf de 2 ml, posteriormente fueron llevadas a cámara con UV donde se desinfectaron superficialmente adicionando etanol al 70 % por 3 min, luego se eliminó y se adicionó NaClO al 1% por 30 seg, se les enjuagó 3 veces con agua destilada y esterilizada, posterior-

mente las muestras fueron maceradas, utilizándose una parte para la extracción de ADN (metagenómica) (Díaz et al., 2018).

#### **Microbiota intestinal mediante técnicas dependientes del medio de cultivo**

Parte de las muestras maceradas, fueron agregadas por separado a 1 ml de agua destilada, se homogenizo y se tomaron 20 µl de las muestras para ser esparcidas en cajas petri conteniendo el medio de cultivo TSA, las cuales fueron incubadas por 24 horas, posteriormente purificadas y cultivadas en caldo LB por 24 horas (Díaz et al., 2018).

#### **Extracción de ADN de la microbiota intestinal mediante técnicas independientes y dependientes del medio de cultivo**

Para extraer el ADN metagenómico de la microbiota intestinal mediante técnicas independientes del medio de cultivo, se tomó una parte de cada muestra macerada y se procedió con la aplicación del protocolo recomendado por el kit comercial PowerSoil® DNA Isolation Kit, (Josefsen et al. 2015). Así mismo para la microbiota intestinal mediante técnicas dependientes del medio de cultivo, se usaron cepas bacterianas purificadas las cuales fueron centrifugadas a 13,000 rpm, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue resuspendido en 1 ml de solución tampón TE (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA). Las bacterias fueron sometidas a una lisis celular por adición de 30 µl de SDS (10%) y 3 µl de proteinasa K (37 °C, 1 hora), se añadió 100 µl de NaCl (5M) y 80 µl de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65 °C) y se incubaron a 65 °C por 10 min. Posteriormente, se adicionó cloroformo/alcohol isoamil (24:1) y tras centrifugarse a 13,000 rpm por 5 min, se añadió 0,6 ml de isopropanol, volviéndose a centrifugar a 1,200 rpm por 5 min, se descartó al

sobrenadante y al precipitado se le adicionó 1ml de etanol frío, y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm 5 min, se eliminó el etanol mediante secado a temperatura ambiente por 5 min, y se obtuvo los ácidos nucleicos a los cuales se les adicionaron 30 µl de tampón TE y 1 µl de solución de RNasa a 37 °C por 1 hora para eliminar el ARNs y obtener el ADN puro (Díaz et al., 2018 y Ribière et al., 2019).

#### **Amplificación del gen del ADNr 16S**

Se utilizaron los primers universales 27-f Forward 5'AGAGTTTGATCMTGGCTC- 3' y 1492-r Reverse 5' - TACGGYTACCTTGTACGACTT - 3' (Belkaid et al. 2017), para lo cual se utilizó un mix de reacción para la amplificación del gen del ADNr 16S compuesto de Buffer Taq 10X 2,5µL, MgCl<sub>2</sub> 25mM 2,5µL, dNTP's 10mM 0,5µL, Taq Polimerase 5U/ µL 0,1µL, 16s ARNr F 0,6, 16s ARNr R 0,6, Agua ultra pura 16,2µL, ADN 3µL, con un volumen final 25µL. La PCR con un programa de desnaturalización inicial 94 °C en 5 min 1 ciclo, y otro por 30 seg, Hibridación 49 °C en 60 seg, Elongación de 72°C por 1 min con 35 ciclos, y la final 72 °C por 4 min por 1 ciclo y a temperatura final de conservación de 4 °C (Díaz et al. 2018).

#### **Obtención de la secuencia parcial del gen del ADN ribosómico 16S**

La secuenciación nucleotídica se realizó empleando primers internos 16S ADNr 518F y 16S ADNr 800R, las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas con el software BLAST usando la base de datos del 16S ADNr del GEN BANK y el programa MEGA 6. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information - USA).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La identificación molecular de las “abejas sin aguijón”, fue mediante tres locis genéticos distintos: Citocromo c oxidasa (COI), 28S ribosomal RNA y gen 16S rRNA, utilizados en la identificaciones de himenópteros (González et al., 2019; Engel, et al., 2020) y para la identificación de los géneros: *Cephalotrigona* sp., *Geotrigona* sp., *Lestrimelitta* sp., *Melipona* sp., *Nannotrigona* sp., *Oxytrigona* sp., *Plebeia* sp., *Scaptotrigona*, sp., *Trigona* sp. y *Trigonisca* sp., mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el uso del análisis bioinformático. Resultados concordantes con los reportados por (Engel et al., 2017; Rasmussen et al., 2017; Delgado et al., 2019; Álvarez, et al., 2020; Janio et al., 2020; Pazmiño-Palomino et al., 2021).

#### **En la comunidad bacteriana**

##### **a. Microbiota intestinal independiente de medio de cultivo**

Mediante metagenómica se identificó 85 géneros de bacterias que conforman la microbiota interna del estado de huevo en *M. mimetica* (Tabla 1), siendo *Acinetobacter* sp. 17,663%, *Lactobacillus* sp. 13,411%, *Alishewanella* sp. 11,350%, *Shewanella* sp.

11,039% y *Pseudomonas* sp., 8,547%, siendo los de mayor porcentaje los 5 primeros de la tabla; en el estado de larva fueron identificados 14 géneros (Tabla 2), de los cuales *Lactobacillus* sp. 55,213%, *Coprobacillus* sp. 25,489%, *Clostridium* sp. 12,754% y *Pediococcus* sp. 6,536%, los porcentajes más representativos; en pupa 79 géneros (Tabla 3), *Acinetobacter* sp. 21,188%, *Staphylococcus* sp. 8,118%, *Lactobacillus* sp. 7,909%, *Planomicrobium* sp. 6,531%, *Corynebacterium* sp. 5,785%, *Micrococcus* sp. 5,670%, *Kocuria* sp. 5,42% y *Brevundimonas* sp. 5,402%, siendo los 8 primeros los de mayor porcentaje; para estado adulto (obrera) (Tabla 4), se identificó 53 géneros bacterianos, siendo los 3 primeros los de mayor porcentaje *Lactobacillus* sp. 91,81%, *Pediococcus* sp. 5,10% y *Halospirulina* sp. 2,4%. Además, se identificó 6 géneros de bacterias presentes en la microbiota de los estados de desarrollo (Tabla 5), siendo *Lactobacillus* sp., el de mayor porcentaje, resultados que concuerdan con los reportados por (Dürre et al., 2014; Forsgren et al., 2017; Belkaid et al., 2017; Ngalimat et al., 2019; Ribière et al., 2019; Romero et al., 2019; Rouzé et al., 2019).

**Tabla 1**Géneros de bacterias identificados en la microbiota interna del estado de huevo de *M. mimetica*

Nº	Género	Porcentaje	Nº	Género	Porcentaje
1	<i>Acinetobacter</i> sp.	17,663	44	<i>Haliscomenobacter</i> sp.	0,010
2	<i>Lactobacillus</i> sp.	13,411	45	<i>Polaribacter</i> sp.	0,010
3	<i>Alishewanella</i> sp.	11,350	46	<i>Thalassomonas</i> sp.	0,010
4	<i>Shewanella</i> sp.	11,039	47	<i>Roseovarius</i> sp.	0,010
5	<i>Pseudomonas</i> sp.	8,547	48	<i>Thalassobius</i> sp.	0,010
6	<i>Cloacibacterium</i> sp.	3,705	49	<i>Bdellovibrio</i> sp.	0,006
7	<i>Kaistobacter</i> sp.	3,497	50	<i>Clostridium</i> sp.	0,006
8	<i>Intestinibacter</i> sp.	3,381	51	<i>Demequina</i> sp.	0,006
9	<i>Corynebacterium</i> sp.	2,960	52	<i>Escherichia</i> sp.	0,006
10	<i>Fingoldia</i> sp.	2,707	53	<i>Granulosicoccus</i> sp.	0,006
11	<i>Streptococcus</i> sp.	2,687	54	<i>Lewinella</i> sp.	0,006
12	<i>Ruminococcus</i> sp.	2,498	55	<i>Sagittula</i> sp.	0,006
13	<i>Paracoccus</i> sp.	2,476	56	<i>Spongiimonas</i> sp.	0,006
14	<i>Bacillus</i> sp.	2,293	57	<i>Verrucomicrobium</i> sp.	0,006
15	<i>Aliihoeflea</i> sp.	2,090	58	<i>Agarivorans</i> sp.	0,003
16	<i>Brevundimonas</i> sp.	1,865	59	<i>Alkaliphilus</i> sp.	0,003
17	<i>Peptoniphilus</i> sp.	1,438	60	<i>Bergeyella</i> sp.	0,003
18	<i>Lysobacter</i> sp.	1,243	61	<i>Chloroflexus</i> sp.	0,003
19	<i>Rhodobacter</i> sp.	1,072	62	<i>Citricella</i> sp.	0,003
20	<i>Pantoea</i> sp.	0,857	63	<i>Coxiella</i> sp.	0,003
21	<i>Sphaerobacter</i> sp.	0,822	64	<i>Dechloromarinus</i> sp.	0,003
22	<i>Rhodovulum</i> sp.	0,482	65	<i>Desulfuromusa</i> sp.	0,003
23	<i>Actinotalea</i> sp.	0,462	66	<i>Donghicola</i> sp.	0,003
24	<i>Thiovirga</i> sp.	0,231	67	<i>Dyella</i> sp.	0,003
25	<i>Empedobacter</i> sp.	0,228	68	<i>Enterococcus</i> sp.	0,003
26	<i>Pediococcus</i> sp.	0,128	69	<i>Flexibacter</i> sp.	0,003
27	<i>Roseobacter</i> sp.	0,125	70	<i>Haliaea</i> sp.	0,003
28	<i>Candidatus</i> sp.	0,096	71	<i>Haloferula</i> sp.	0,003
29	<i>Helicobacter</i> sp.	0,058	72	<i>Holospora</i> sp.	0,003
30	<i>Spongiibacter</i> sp.	0,058	73	<i>Imtechella</i> sp.	0,003
31	<i>Vibrio</i> sp.	0,045	74	<i>Jannaschia</i> sp.	0,003
32	<i>Cronobacter</i> sp.	0,042	75	<i>Marivita</i> sp.	0,003
33	<i>Kwoniella</i> sp.	0,039	76	<i>Mycoplasma</i> sp.	0,003
34	<i>Pedobacter</i> sp.	0,032	77	<i>Oleispira</i> sp.	0,003
35	<i>Raoultella</i> sp.	0,029	78	<i>Oligoflexus</i> sp.	0,003
36	<i>Flavobacterium</i> sp.	0,029	79	<i>Owenweeksia</i> sp.	0,003
37	<i>Olleya</i> sp.	0,026	80	<i>Pinguicoccus</i> sp.	0,003
38	<i>Tenacibaculum</i> sp.	0,026	81	<i>Pirellula</i> sp.	0,003
39	<i>Phaeobacter</i> sp.	0,016	82	<i>Synechococcus</i> sp.	0,003
40	<i>Rubritalea</i> sp.	0,016	83	<i>Terasakiella</i> sp.	0,003
41	<i>Ruegeria</i> sp.	0,013	84	<i>Tropicibacter</i> sp.	0,003
42	<i>Tabrizicola</i> sp.	0,013	85	<i>Ulvibacter</i> sp.	0,003
43	<i>Chlorella</i> sp.	0,010			

**Tabla 2**Géneros de bacterias identificados en la microbiota intestinal del estado de larva de *M. mimetica*

Nº	Genero	Porcentaje
1	<i>Lactobacillus</i> sp.	55,213
2	<i>Coprobacillus</i> sp.	25,489
3	<i>Clostridium</i> sp.	12,754
4	<i>Pediococcus</i> sp.	6,536
5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0,003
6	<i>Streptococcus</i> sp.	0,001
7	<i>Algoriphagus</i> sp.	0,001
8	<i>Barnesiella</i> sp.	0,001
9	<i>Candidatus stoquefichus</i> sp.	0,001
10	<i>Halospirulina</i> sp.	0,001
11	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,001
12	<i>Stakelama</i> sp.	0,001
13	<i>Staphylococcus</i> sp.	0,001
14	<i>Acinetobacter</i> sp.	0,001

**Tabla 3**Géneros de bacterias identificados en la microbiota intestinal del estado de pupa de *M. mimetica*

Nº	Genero	Porcentaje	Nº	Genero	Porcentaje
1	<i>Acinetobacter</i> sp.	21,188	41	<i>Pediococcus</i> sp.	0,238
2	<i>Staphylococcus</i> sp.	8,118	42	<i>Peptoniphilus</i> sp.	0,226
3	<i>Lactobacillus</i> sp.	7,909	43	<i>Oceanicola</i> sp.	0,221
4	<i>Planomicrobium</i> sp.	6,531	44	<i>Marmoricola</i> sp.	0,198
5	<i>Corynebacterium</i> sp.	5,785	45	<i>Jannaschia</i> sp.	0,182
6	<i>Micrococcus</i> sp.	5,670	46	<i>Pantoea</i> sp.	0,165
7	<i>Kocuria</i> sp.	5,421	47	<i>Shigella</i> sp.	0,156
8	<i>Brevundimonas</i> sp.	5,402	48	<i>Thermincola</i> sp.	0,120
9	<i>Pseudomonas</i> sp.	3,907	49	<i>Cronobacter</i> sp.	0,084
10	<i>Massilia</i> sp.	2,375	50	<i>Sulfurimonas</i> sp.	0,081
11	<i>Vibrio</i> sp.	1,979	51	<i>Raoultella</i> sp.	0,073
12	<i>Lentibacillus</i>	1,836	52	<i>Tropicibacter</i> sp.	0,070
13	<i>Streptomyces</i> sp.	1,624	53	<i>Ruegeria</i> sp.	0,070
14	<i>Loktanella</i> sp.	1,557	54	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,067
15	<i>Turicella</i> sp.	1,478	55	<i>Rothia</i> sp.	0,061
16	<i>Blastococcus</i> sp.	1,428	56	<i>Pectobacterium</i> sp.	0,059
17	<i>Tabrizicola</i> sp.	1,425	57	<i>Poseidonocella</i> sp.	0,059
18	<i>Comamonas</i> sp.	1,333	58	<i>Roseivivax</i> sp.	0,048
19	<i>Rhodovulum</i> sp.	1,216	59	<i>Serratia</i> sp.	0,048
20	<i>Streptococcus</i> sp.	1,012	60	<i>Roseobacter</i> sp.	0,042
21	<i>Cellulomonas</i> sp.	0,794	61	<i>Legionella</i> sp.	0,031
22	<i>Tropicimonas</i> sp.	0,794	62	<i>Enhydrobacter</i>	0,022
23	<i>Escherichia</i> sp.	0,782	63	<i>Candidatus saccharimonas</i>	0,020
24	<i>Eubacterium</i> sp.	0,771	64	<i>Planococcus</i> sp.	0,020
25	<i>Halospirulina</i> sp.	0,721	65	<i>Roseburia</i> sp.	0,020
26	<i>Paracoccus</i> sp.	0,679	66	<i>Lysinibacillus</i> sp.	0,011
27	<i>Anaerococcus</i> sp.	0,668	67	<i>Pseudoruegeria</i> sp.	0,011
28	<i>Enterobacter</i> sp.	0,592	68	<i>Aquabacterium</i> sp.	0,008
29	<i>Rhodobacter</i> sp.	0,590	69	<i>Hydrogenophaga</i> sp.	0,008
30	<i>Chryseobacterium</i> sp.	0,539	70	<i>Pelomonas</i> sp.	0,006
31	<i>Collinsella</i> sp.	0,456	71	<i>Phaeobacter</i> sp.	0,006
32	<i>Sphingobium</i> sp.	0,422	72	<i>Roseinatronobacter</i> sp.	0,006
33	<i>Prevotella</i> sp.	0,411	73	<i>Sagittula</i> sp.	0,006
34	<i>Flavobacterium</i> sp.	0,377	74	<i>Barnesiella</i> sp.	0,003
35	<i>Clostridium</i> sp.	0,360	75	<i>Bordetella</i> sp.	0,003
36	<i>Citrobacter</i> sp.	0,313	76	<i>Maritimibacter</i> sp.	0,003
37	<i>Bacillus</i> sp.	0,296	77	<i>Marivita</i> sp.	0,003
38	<i>Wohlfahrtiimonas</i> sp.	0,277	78	<i>Phyllobacterium</i> sp.	0,003
39	<i>Ornithinimicrobium</i> sp.	0,260	79	<i>Synechococcus</i> sp.	0,003
40	<i>Achromobacter</i> sp.	0,249			

**Tabla 4**Géneros de bacterias identificados en la microbiota intestinal del estado de adulto (obrera) de *M. mimetica*

Nº	Género	Porcentaje	Nº	Género	Porcentaje
1	<i>Lactobacillus</i> sp.	91,809	28	<i>Weissella</i> sp.	0,001
2	<i>Pediococcus</i> sp.	5,101	29	<i>Achromatium</i> sp.	0,001
3	<i>Halospirulina</i> sp.	2,399	30	<i>Algoriphagus</i> sp.	0,001
4	<i>Acetobacter</i> sp.	0,422	31	<i>Anoxybacillus</i> sp.	0,001
5	<i>Herbiconiux</i> sp.	0,094	32	<i>Arthrobacter</i> sp.	0,001
6	<i>Streptococcus</i> sp.	0,060	33	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0,001
7	<i>Bacillus</i> sp.	0,024	34	<i>Candidatus bacilloplasma</i>	0,001
8	<i>Staphylococcus</i> sp.	0,011	35	<i>Comamonas</i> sp.	0,001
9	<i>Acinetobacter</i> sp.	0,009	36	<i>Donghicola</i> sp.	0,001
10	<i>Azospirillum</i> sp.	0,007	37	<i>Enterobacter</i> sp.	0,001
11	<i>Clostridium</i> sp.	0,006	38	<i>Escherichia</i> sp.	0,001
12	<i>Barnesiella</i> sp.	0,006	39	<i>Eubacterium</i> sp.	0,001
13	<i>Enterococcus</i> sp.	0,005	40	<i>Granulosicoccus</i> sp.	0,001
14	<i>Asaia</i> sp.	0,003	41	<i>Helicobacter</i> sp.	0,001
15	<i>Candidatus odysella</i>	0,003	42	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	0,001
16	<i>Kocuria</i> sp.	0,003	43	<i>Lentibacillus</i> sp.	0,001
17	<i>Pseudomonas</i> sp.	0,003	44	<i>Lyticum</i> sp.	0,001
18	<i>Lachnoclostridium</i> sp.	0,003	45	<i>Massilia</i> sp.	0,001
19	<i>Brevundimonas</i> sp.	0,002	46	<i>Micrococcus</i> sp.	0,001
20	<i>Loktanella</i> sp.	0,002	47	<i>Paracoccus</i> sp.	0,001
21	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	0,002	48	<i>Photobacterium</i> sp.	0,001
22	<i>Turicella</i> sp.	0,002	49	<i>Planomicrobium</i> sp.	0,001
23	<i>Candidatus Stoquefichus</i>	0,001	50	<i>Shewanella</i> sp.	0,001
24	<i>Chryseobacterium</i> sp.	0,001	51	<i>Spongiibacter</i> sp.	0,001
25	<i>Conexibacter</i> sp.	0,001	52	<i>Tabrizicola</i> sp.	0,001
26	<i>Corynebacterium</i> sp.	0,001	53	<i>Vibrio</i> sp.	0,001
27	<i>Rubellimicrobium</i> sp.	0,001			

**Tabla 5**Géneros de bacterias identificados en la microbiota de los estados de desarrollo de *M. mimetica*

Género	Huevo	Larva	Pupa	Adulto
<i>Acinetobacter</i> sp.	17,663	0,001	21,188	0,009
<i>Clostridium</i> sp.	0,006	12,754	0,360	0,006
<i>Lactobacillus</i> sp.	13,411	55,213	7,909	91,809
<i>Pediococcus</i> sp.	0,128	6,536	0,238	5,101
<i>Pseudomonas</i> sp.	8,547	0,001	3,907	0,003
<i>Streptococcus</i> sp.	2,687	0,001	1,012	0,060

**Tabla 6**

Especies bacterianas identificadas molecularmente a partir de colonias aisladas en medios de cultivo

Nº	Especie bacteriana	Muestra	Total score	Query Cove	Evalúe	Per. Ident	Accesión
1	<i>Bacillus subtilis</i> <i>subsp. subtilis</i>	larva	1338	100%	0.0	100,00%	CP051466,1
2	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	Pupa	2304	100%	0.0	99,62%	CP044310,1
3	<i>Humibacter</i> sp.	Adulto	2469	99%	0.0	98,99%	CP031192,1
4	<i>Acinetobacter nectaris</i>	Adulto	422	97%	5e-114	98,33%	MG645311,1
5	<i>Acinetobacter</i> sp.	Adulto	1269	100%	0.0	99,29%	HQ284953,1
6	<i>Fructobacillus</i> sp.	Adulto	409	100%	4e-110	96,39%	JN167936,1

### b. Microbiota intestinal pendiente de medio de cultivo

Mediante técnicas de medio de cultivo (Tabla 6), fueron identificadas seis cepas bacterianas provenientes de los estados de desarrollo de *M. mimetica* con su respectiva homología para huevo, *Bacillus subtilis subsp. Subtilis* con 100%, pupa *Paenibacillus xylanilyticus* con 99,62% y adulto cuatro especies con su respectiva homología, *Humibacter* sp. 98,99%, *Acinetobacter nectaris* con 98,33%, *Acinetobacter* sp., y *Fructobacillus* sp. con 100%.

Los resultados obtenidos muestran una variada microbiota en los estados de vida de *M. mimetica*, donde se aprecia seis géneros muy relacionados a estos, de los cuales *Acinetobacter* sp., es reportado que habita en el agua y suelo, siendo un importante patógeno de infecciones hospitalarias; *Clostridium* sp., habitante de la flora intestinal de animales y humanos reportados por degradar azúcares, alcoholes, aminoácidos, purinas, pirimidinas y polímeros como el almidón y la celulosa, (Dürre et al., 2014); *Pseudomonas* presente en el suelo, agua dulce, filofera y rizofera de plantas e insectos, así mismo; *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. y *Streptococcus* sp., que pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) de gran importancia en la salud de las abejas, (Díaz et al.,

2017; Kwong et al., 2016 y Ribièrre et al., 2019), y la mayor presencia de *Lactobacillus* sp., como indicador de la buena salud de las abejas, (Ribbera et al., 2013).

Los microorganismos que forman parte de la microbiota de las abejas sin aguijón, provienen en gran parte de las fuentes de alimento como el polen y néctar colectados para la alimentación de los miembros de la colonia, así como también de agua y materiales que usan y manejan para la construcción de sus nidos, envases para almacenar la miel y el polen. Resultados que concuerdan con los reportados por; (Bárbara et al., 2015; Zheng et al., 2019., Vit et al., 2018; Voulgari-Kokota et al., 2019). La presencia de estos géneros de bacterias en la microbiota de *M. mimetica* al igual que en otros animales es de importancia de la salud de los miembros de la colonia cumpliendo funciones metabólicas en la digestión, transformación de los alimentos y el mejoramiento del sistema inmune, estos resultados concuerdan con los reportados por (Hansen et al., 2014; Leonhardt et al., 2014; Shanks et al., 2017., Alberoni et al., 2018; Endo et al., 2018; Menegatti et al., 2018; Zheng et al., 2019).

Los resultados de esta investigación nos permitirán realizar otros trabajos como la biología, comportamiento y formas de conservación de *M. mimetica* y su relación con su microbiota.

### CONCLUSIONES

A nivel molecular, se identificaron los géneros de "abejas nativas sin aguijón": *Cephalotrigona* sp., *Geotrigona* sp., *Lestrimelitta* sp., *Melipona* sp., *Nannotrigona* sp., *Oxytrigona* sp., *Plebeia* sp., *Scaptotrigona* sp., *Trigona* sp. y *Trigonisca* sp. Mediante el uso de tres locis genéticos distintos: Citocromo c oxidasa (COI), 28S ribosomal RNA y gen 16S rRNA y del análisis bioinformático.

En la microbiota interna de *M. mimetica* de los géneros de bacterias identificados, los de mayor porcentaje en los estados de desarrollo fueron: en huevo 85 géneros, donde *Acinetobacter* sp. 17,663%, *Lactobacillus* sp. 13,411%, *Alishewanella* sp. 11,350%, *Shewanella* sp. 11,039% y *Pseudomonas* sp. 8,547%; en larva: 4 géneros,

siendo *Lactobacillus* sp. 55,213%, *Coprobacillus* sp. 25,489%, *Clostridium* sp. 12,754% y *Pediococcus* sp. 6,536%; en pupa 79 géneros: *Acinetobacter* sp. 21,188%, *Staphylococcus* sp. 8,118%, *Lactobacillus* sp. 7,909%, *Planomicrobium* sp. 6,531%, *Corynebacterium* sp. 5,785%, *Micrococcus* sp. 5,670%, *Kocuria* sp. 5,421% y *Brevundimonas* sp. 5,402%; y en adulto (obrero) se identificaron 53 géneros bacterianos; *Lactobacillus* sp. 91,81%, *Pediococcus* sp. 5,10% y *Halospirulina* sp. 2,4%, los de mayor porcentaje respectivamente.

Estos resultados conducen a realizar un programa de conservación y valorización mediante la crianza masal de "abejas nativas sin aguijón", generando así una fuente de ingreso para agricultores y ganaderos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Tumbes por el financiamiento del Proyecto a través de Recursos Canon.

A Incabiotec y su equipo de investigadores por la identificación molecular de las especies.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, L., & L. Mariano. (2020). Una especie nueva de *Trigonisca* y nuevos registros de abejas sin aguijón para la Argentina (Hymenoptera: Apidae). *Caldasia*, 40(2), 232-245.
- Alberoni, D., Baffoni, L., Gaggia, F., Ryan, P. M., Murphy, K., Ross, P. R., Stanton, C., & Di Gioia. (2018). Impact of beneficial bacteria supplementation on the gut microbiota, colony development and productivity of *Apis mellifera* L. *Beneficial microbes*, 9(2), 269-278.
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez, D., & M. Aldasoro. (2018). Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México con catálogo de especies. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). 1ra. (Ed). Chiapas, México. 147 p.
- Bárbara, M. S., Machado, C. S., Sodré, Gda. S., Dias, L. G., Estevinho, L. M., & de Carvalho, C. A. (2015). Microbiological Assessment, Nutritional Characterization and Phenolic Compounds of Bee Pollen from *Melipona mandacaia* Smith. *Molecules*, 20(7), 12525-44.
- Belkaid, Y., & O. Harrison. 2017. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity*, 46(4), 562-576.
- Chambusarakum, L., & Ullman, D. (2008). Characterization of bacterial symbionts in *Frankliniella occidentalis* (Pergande), Western flower thrips. *J Invertebr Pathol*, 99(3), 318-25.
- Delgado, C., & C. Rasmussen. (2019). Abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) en Loreto, Perú.
- Díaz, S., Blochtein B., Sattler A., Zuge, V., & L. Haag. (2017). Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 143, 35-39.
- Díaz-Castillo, N., Sánchez, D., Oyola, M., Masías, P., García-Seminario, R., Cedeño, V., & E. Mialhe. (2018). Implementación de una estrategia de espectrometría de doble masa MALDI TOT/TOF para la identificación molecular de bacterias del intestino de trips del banano. *Manglar*, 15(1), 57-65.
- Dürre, P. 2014. Physiology and Sporulation in Clostridium. *Microbiology spectrum*, 2(4), TBS-0010-2012.
- Elizalde, R., Castillo, P., & C. Rasmussen. (2016). Manual de abejas nativas sin aguijón de la reserva de biosfera del noroeste del Perú. Tercera edición.
- Endo, A., Maeno, S., Tanizawa, Y., Kneifel, W., Arita, M., Dicks, L., & E.S. Salminen. (2018). Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. *Applied and environmental microbiology*, 84(19), e01290-18.
- Engel, M., & Rasmussen, C. (2017). Un nuevo subgénero de *Heterotrigona* de Nueva Guinea (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Melittology*: No. 73: Un nuevo subgénero de *Heterotrigona* de Nueva Guinea (Hymenoptera: Apidae).
- Engel, M., González, V., & Rasmussen, C. (2020). An overlooked family-group name among bees: Availability of Coelioxoidini (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Melittology*, 94, 1-3.
- Forsgren, E., Olofsson, T., Vasquez, A., & I. Fries. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie (Celle)*, 41, 99-108.
- González, V., Alvarado, M., & C. Rasmussen. (2019). A new species of *Andinopanurgus* (Hymenoptera: Andrenidae) from high elevations in southern Peru. *Revista Peruana de Biología*, 26(2), 211-216.
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol Ecol. Mar*, 23(6), 1473-96.
- Hebert, P., Ratnasingham, S., Dewaard, J. R., a& Landry, J.F. (2010). Evolutionary biology DNA Barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biol Lett*, 6, 359-362.
- Josefsen, H., Andersen, C., Christensen, J., & Hoorfar, J. (2015). Microbial food safety: Potential of DNA extraction methods for use in diagnostic metagenomics. *Journal of microbiological methods*, 114, 30-34.
- Janio, F., & Freitas, B. (2021). Richness and distribution of the Meliponine fauna (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in the State of Ceará, Brazil. *Annals of Braziliam Academy of Sciences*, 93(3), e20190767.
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374-384.
- Leonhardt, S. D., & M. Kaltenpoth. (2014). Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PLoS one*, 9(8), e105718.
- Menegatti, C., Da Paixão Melo, W. G., Carrão, D. B., De Oliveira, A. R. M., Do Nascimento, F. S., Lopes, N. P., Pupo, M. T. (2018) *Paenibacillus polymyxa* associated with the stingless bee *Melipona scutellaris* produces antimicrobial compounds against Entomopathogens. *J Chem Ecol*, 44(12), 1158-1169.
- Nates-Parra, G., & M. Rosso. (2013). Diversity of Stingless Bees (Hymenoptera: Meliponini) Used in Meliponiculture in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(3), 415-426.
- Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ*, 7, e7478.
- Pazmiño-Palomino, A., & de Oliveira, M. L. (2021). Primer caso de ginandromorfismo en la abeja orquídea *Eulaema meriana* (Olivier) (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiología*, 68(3), ee5778.
- Paludo, R, Pishchany, G., Andrade-Domínguez, A., Silva-Junior, A., Menezes., Nascimento, C., Currie, S., Kolter, R., Clardy, J., & T. Pupo. (2019). Microbial community modulates growth of symbiotic fungus required for stingless bee metamorphosis. *PLoSone*, 14(7), e0219696.
- PM 7/129 (1) DNA. 2016. barcoding as an identification tool for a number of regulated pests. EPP0 Bull, 46, 501-537.
- Rasmussen, C., & Bradley's, J. (2016). Narrative of the cornell entomological expeditionto South America (1919-1920): Collecting localities and entomological travel details. *Journal of the History of Collections*, 28, 137-147.
- Rasmussen, C., & Gonzalez, V. (2017). The neotropical stingless bee genus *Nannotrigona* Cockerell (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): An illustrated key, notes on the types, and designation of lectotypes. *Zootaxa*, 4299, 191-220.
- Ribbera, A., Ji, H. M., Kant, R., Pietili, T. E., Randazzo, C., Paulin, L., & Satokari, R. (2013). Comparative genomic and functional analysis of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains marketed as probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 79(6), 1923-1933.
- Ribière, C., Hegarty, C., Stephenson, H., Whelan, P., O'Toole, P. W., & Whole-Body, W. (2019). Microbiota of the honey bee separate thriving and non-thriving hives. *Microb Ecol*, 78(1),195-205.
- Romero, S., Nastasa, A., Chapman, A., Kwong, W. K., & Foster, L. J. (2019). The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Mol Biol*, 28(4), 455-472.
- Rouzé, R., Moné, A., Delbac, F., Belzunces, L., & Blot, N. (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and environments*, 34(3), 226-233.
- Shanks, L., Haigh, M., Riegler, M., & N. Spooner-Hart. (2017). First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. *Journal of invertebrate pathology*, 144, 7-10.
- Vásquez-García, A., Sangerman-Jarquín, D., & Rindermann, R. (2021). Caracterización de especies de abejas nativas y su relación biocultural en la ixteca Oaxaqueña. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(1), 101-113.
- Vit, P., Vargas, O., López, T., & F. Valle. (2015). Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from el Oro province in Ecuador. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6), 502.
- Vit, P., Maza, F., Ramirez, R., & V. Frisone. (2018). Diversity of Stingless Bees in Ecuador, Pot-Pollen Standards, and Meliponiculture Fostering a Living Museum Meliponini of the World. In Pot- Pollen in Stingless Bee Melittology (pp. 207-227). Cham: Springer International Publishing.
- Voulgari-Kokota, A., Ankenbrand, M. J., Grimmer, G., Steffan-Dewenter, I., & A. Keller. (2019). Linking reserpollen foraging of megachilid bees to their nest bacterial microbiota. *Ecology and evolution*, 9(18), 10788-10800.
- Zheng, H., Steele, M. L., Leonard, S. P., Motta, E. V., & Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab animal*, 47(11), 317-325.
- Zheng, H., Perreau, J., Powell, J. E., Han, B., Zhang, Z., Kwong, W. K., Tringe, S. G., & Moran, N. A. (2019). Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(51), 25909-25916.