



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

***“Implementación de herramientas moleculares para la
identificación de microorganismos en miel de abejas sin aguijón”***

Autor: Doménica Liseth, Cutiopala Estrada

Director: Sarah, Martin Solano Ph.D.

Sangolquí, 25 de febrero de 2026

INTRODUCCIÓN

2

ROL

Polinización



> 20 mil especies

Apidae

Apini

(Abejas melíferas)



Meliponini

(Abejas melíferas
sin aguijón)



ABEJAS SIN AGUIJÓN

Tamaño: 4 a 18 mm

Métodos de defensa:

Ataque

Retiro inmediato

Adaptaciones del nido



Distribución



Ecuador



132 especies



MIEL DE ABEJAS SIN AGUIJÓN



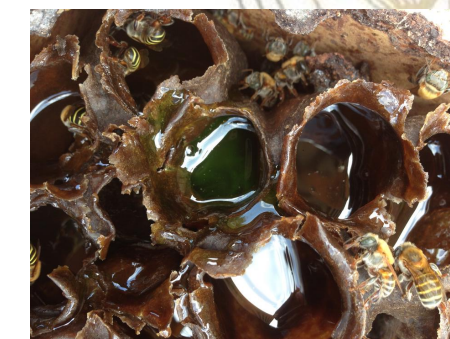
Néctar



Polén



Fermentación



Antioxidante
Antibacterianas
Antiinflamatorias

INTRODUCCIÓN

3

RELACIÓN



-  Polen
-  Suelo
-  Aire
-  Flores
-  Polvo
-  Tracto digestivo



Conocimiento de
microbioma limitado

MÉTODO TRADICIONAL

Basado en cultivo



MÉTODO NUEVO

Herramientas moleculares

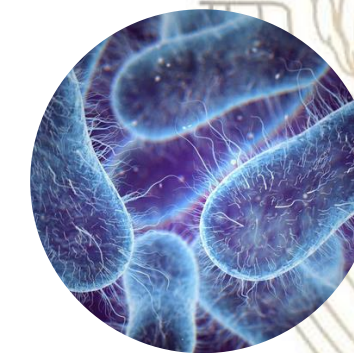


MATRIZ COMPLEJA

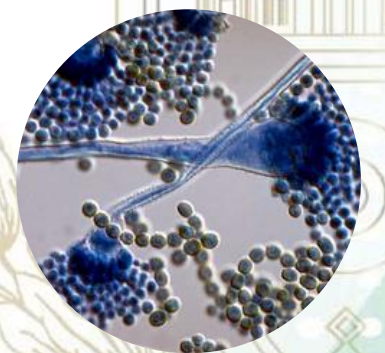


Método de
extracción robusto

MARCADORES MOLECULARES

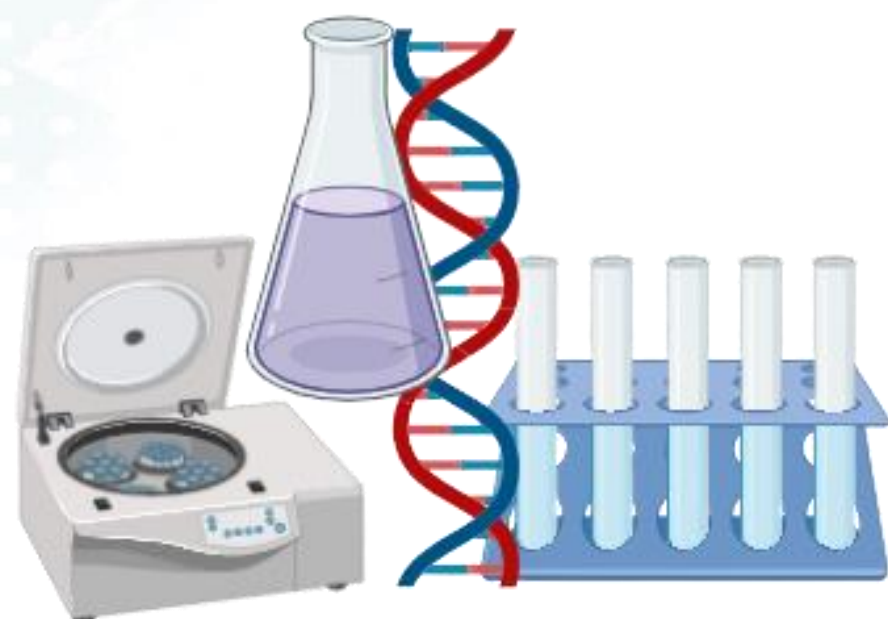


16S rRNA

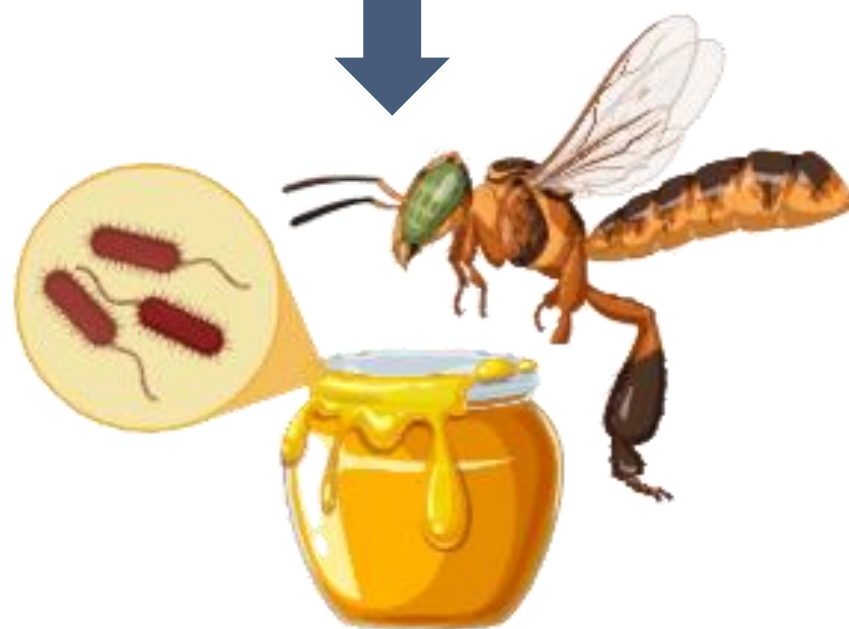


ITS

OBJETIVO GENERAL



Herramientas Moleculares



Miel de abejas sin aguijón

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

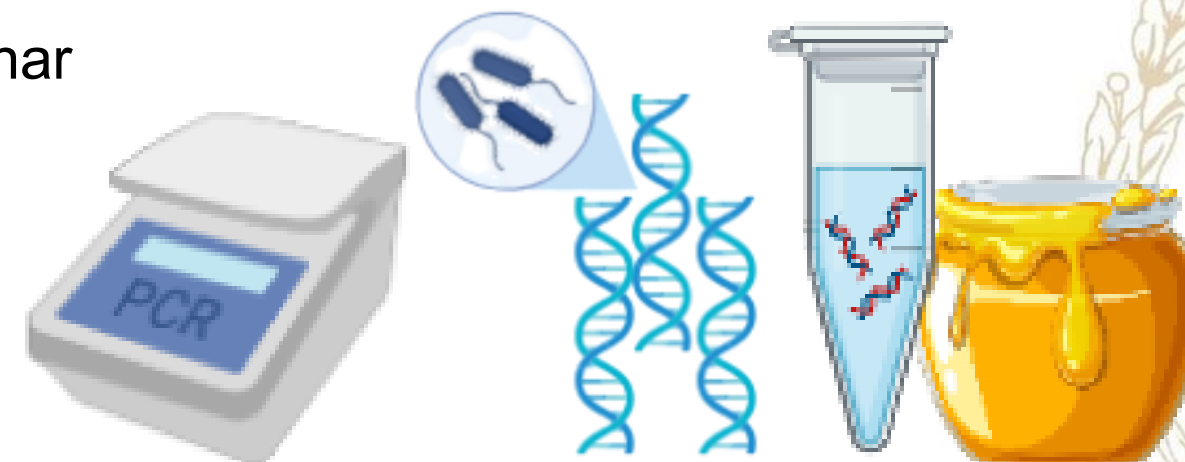
1

Estandarizar



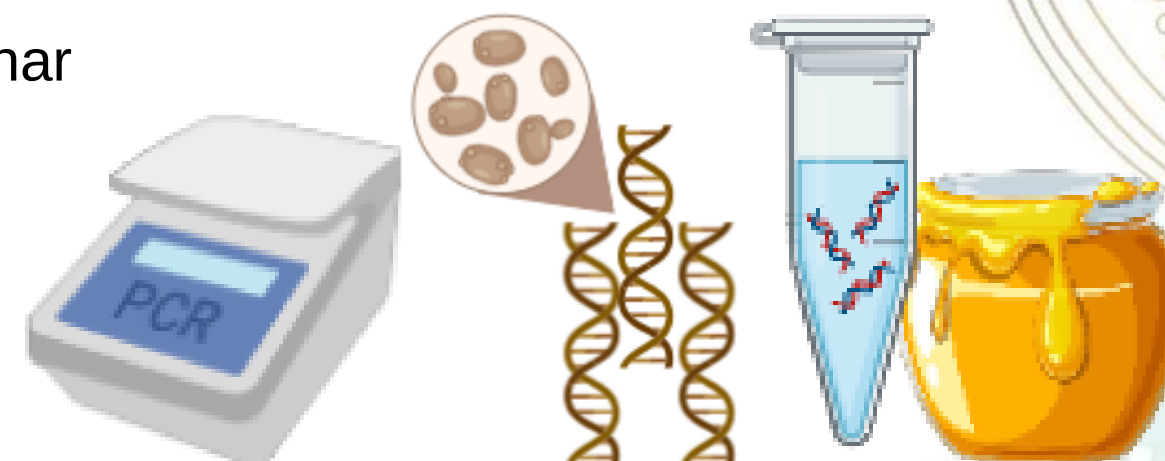
2

Determinar



3

Determinar

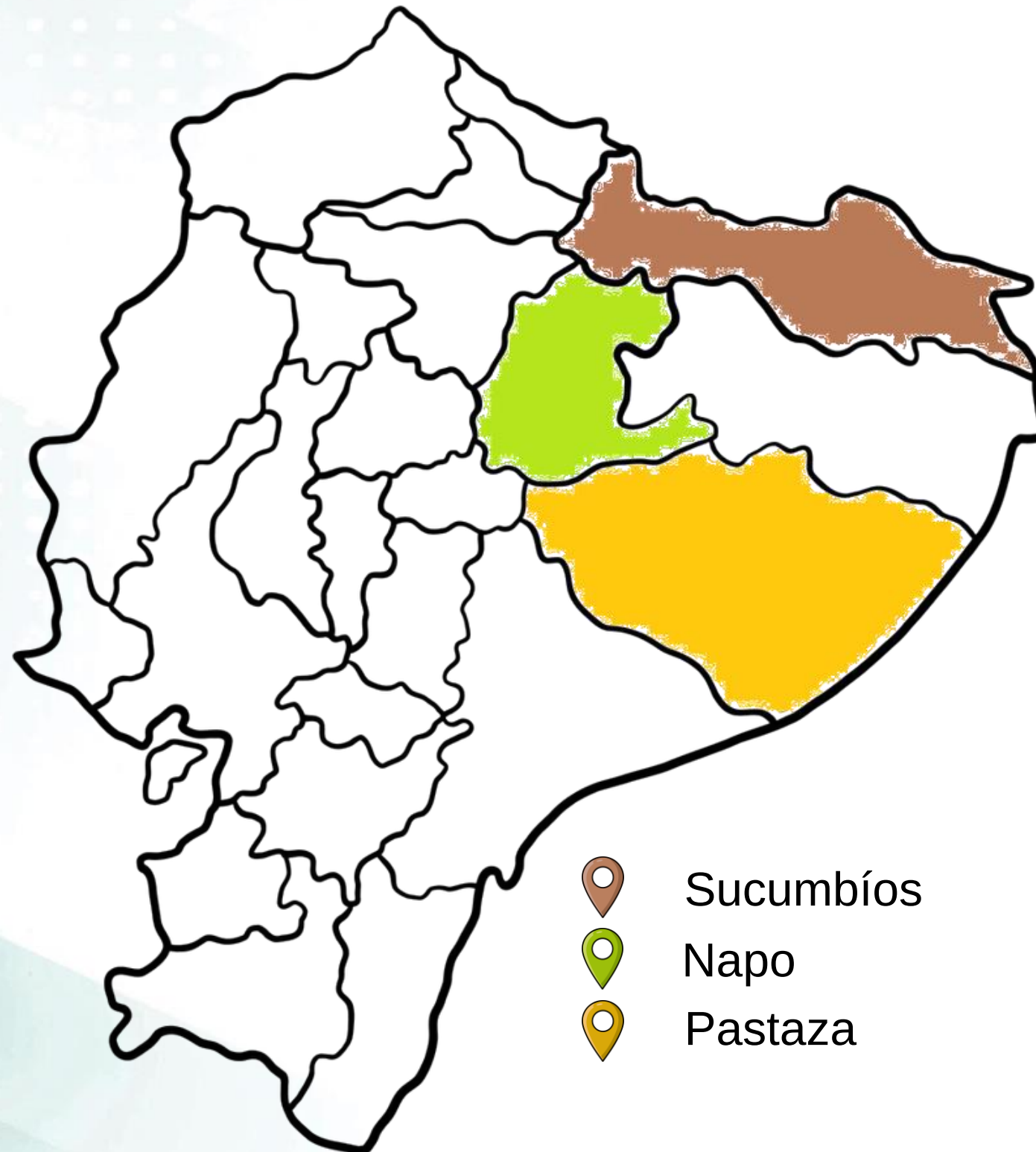




❖ Procedencia de las muestras



Meliponiculture: a sustainable tool in agro-ecological systems for rural communities in Ecuador



51 muestras de miel de abejas sin aguijón de los géneros (n= 6)

Melipona sp.

Scaptotrigona sp.

Nannotrigona sp.



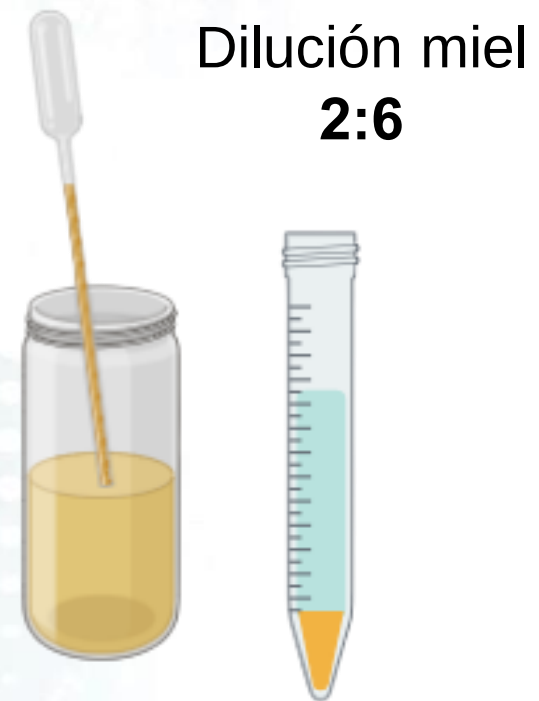
Tetragona sp.

Tetragonisca sp.

Ptilotrigona sp.



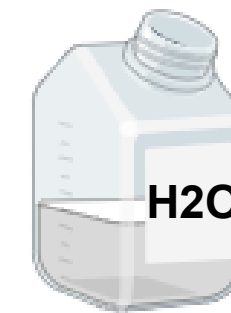
◆ Procesamiento de las muestras



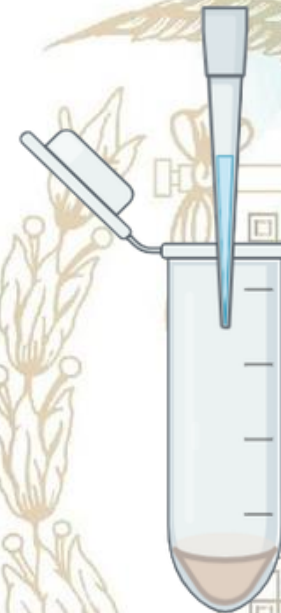
N° Ciclo	mL Miel
1	0.5
2	1.0
3	1.5
4	2.0

Centrifugación

 10 min
 16 °C



Resuspensión del pellet



◆ Procesamiento de las muestras



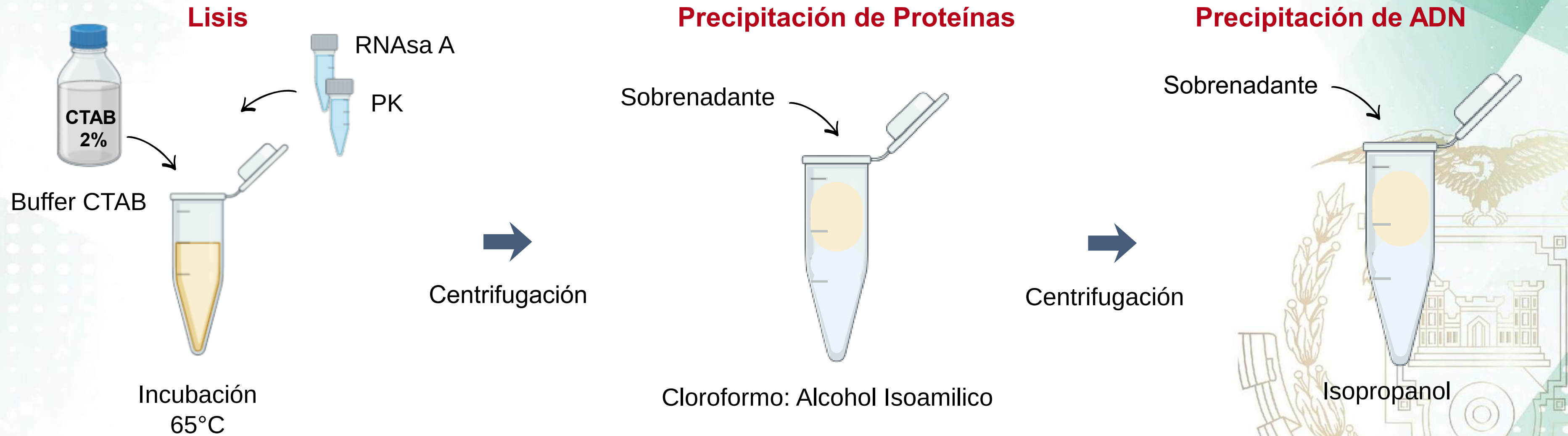
Adición perlas de vidrio



Lisis mecánica

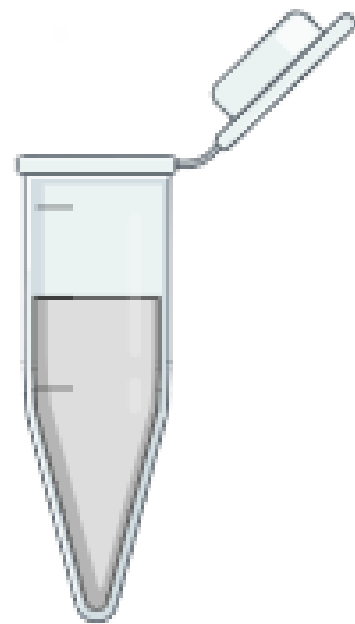


Protocolo inicial de extracción de ADN



◆ *Protocolo inicial de extracción de ADN*

Lavado

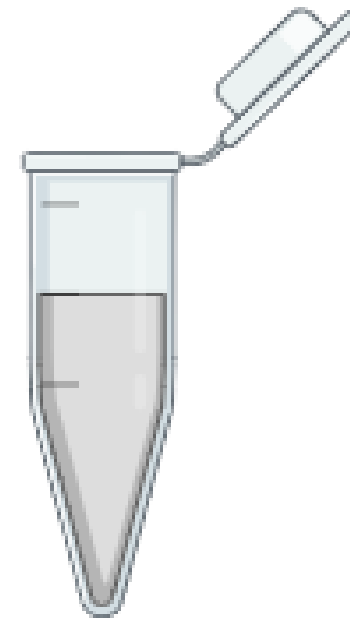


Etanol 70%



Secado

Rehidratación



Agua ultrapura



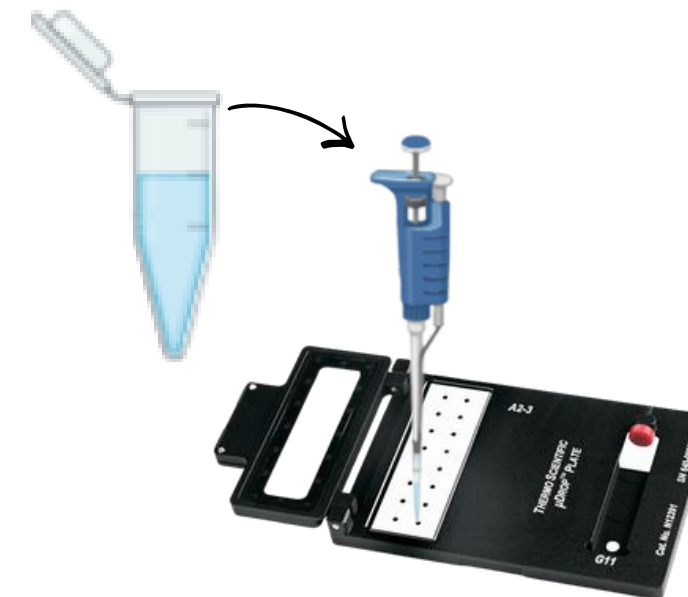
Overnight



► Estandarización protocolo de extracción de ADN

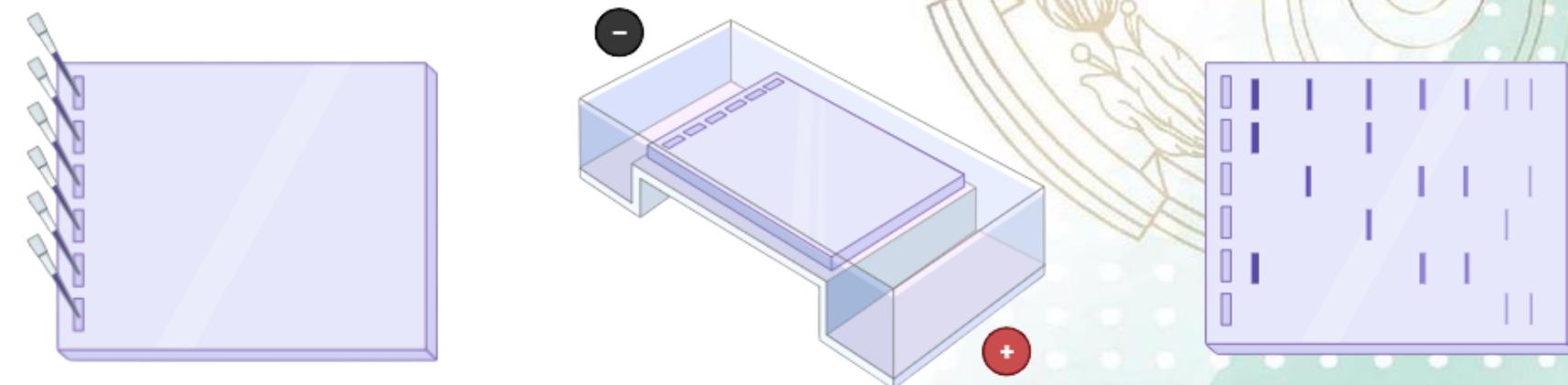
Modificaciones protocolo de extracción		
Paso	Protocolo Inicial	Modificación
RNAsa A	5 μ L	10 μ L 20 μ L 30 μ L
Incubación	90 min	30 min 60 min
Enzimas	Adición simultánea de RNAsa A y Proteinasa K	Variación 1 Variación 2 Variación 3 Variación 4

Cuantificación del ADN



Concentración de ADN (μ g/mL)
Índice de Pureza 260/230
Índice de Pureza 260/280

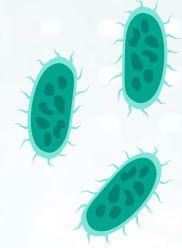
Integridad del ADN



Electroforesis en gel de agarosa



➤ *Análisis Molecular*



PCR Punto Final gen 16S rRNA

Primers: 27F y 1432R

Amplicon: 1 500 pb



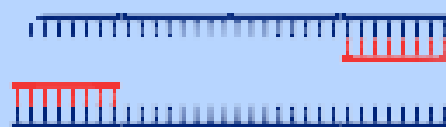
Desnaturalización

95 °C - 30 s

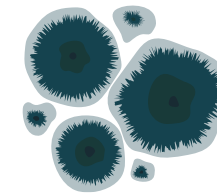
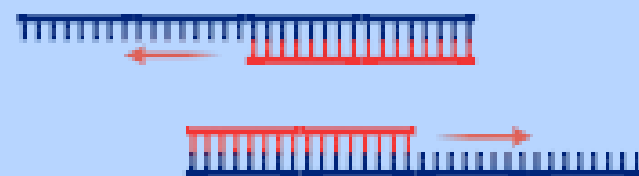


Hibridación

54 °C - 30 s



Extensión: 72 °C - 1.45 min



PCR Punto Final región ITS

Primers: ITS1F e ITS4R

Amplicon: 700 pb



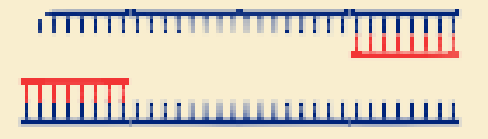
Desnaturalización

95 °C - 30 s

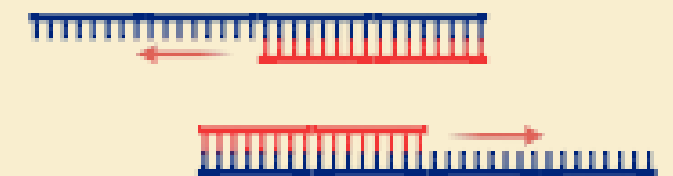


Hibridación

55 °C - 30 s



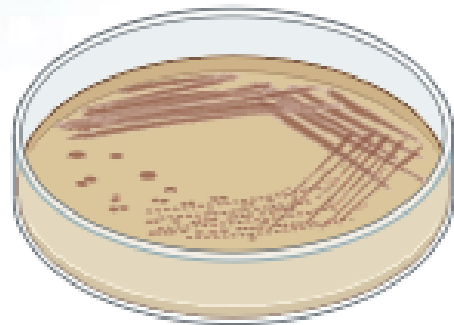
Extensión: 72 °C - 1 min



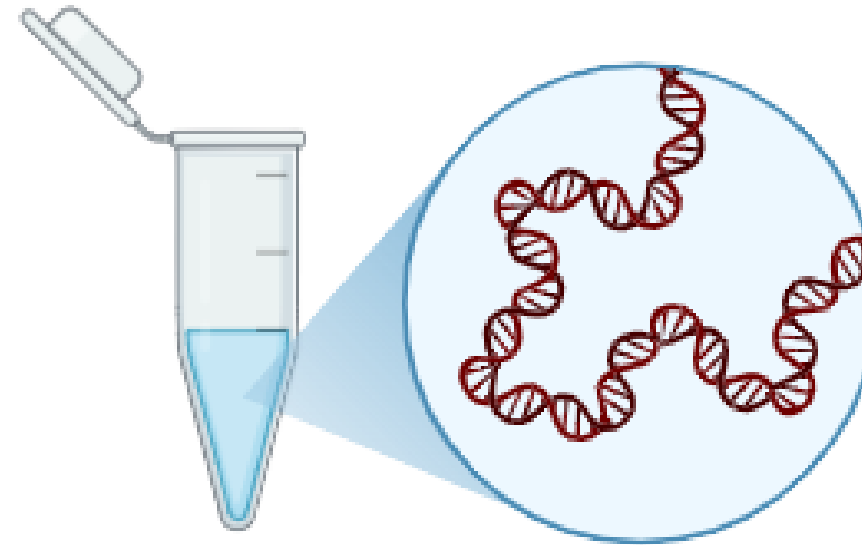


Control Positivo

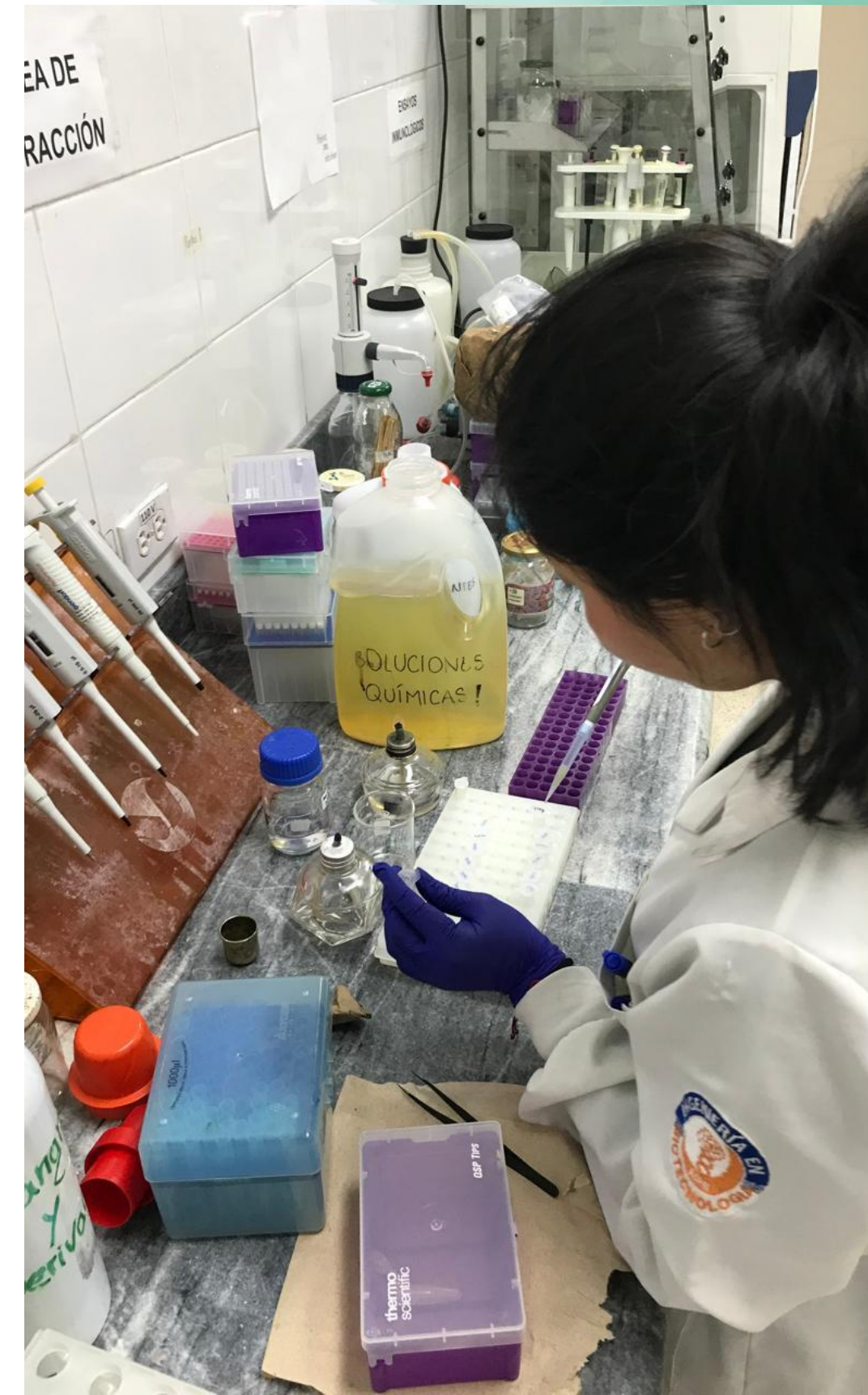
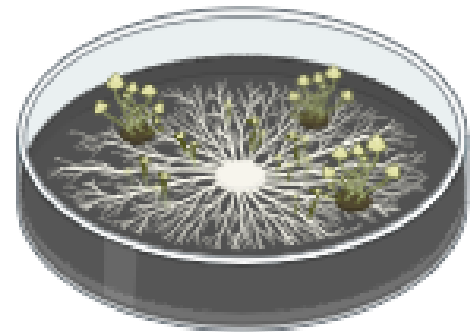
Bacillus cereus



Extracción de ADN con
protocolo optimizado

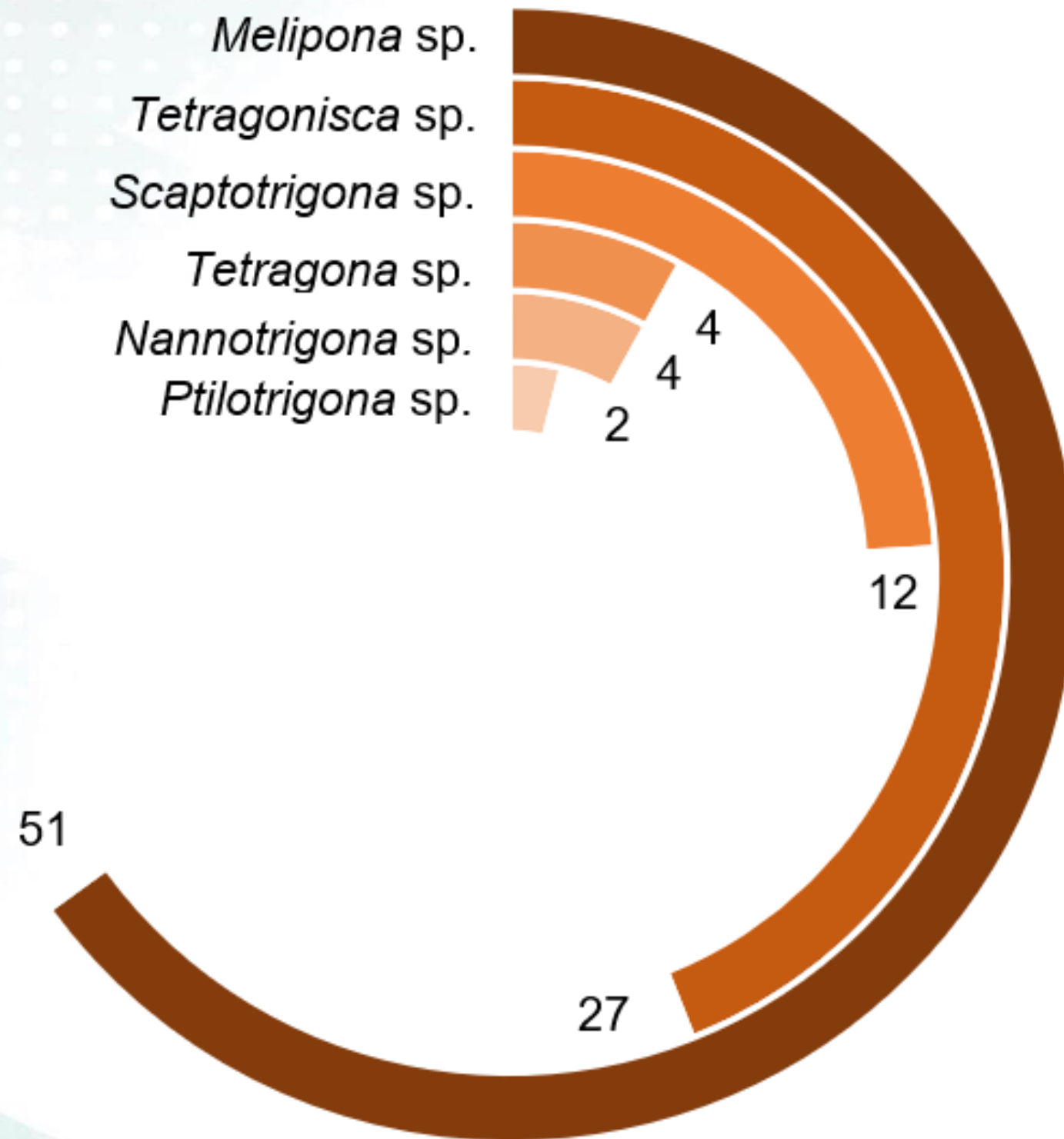


Hongo Filamentoso





► Clasificación de muestras según el género



Mieles del género

***Melipona* sp.**



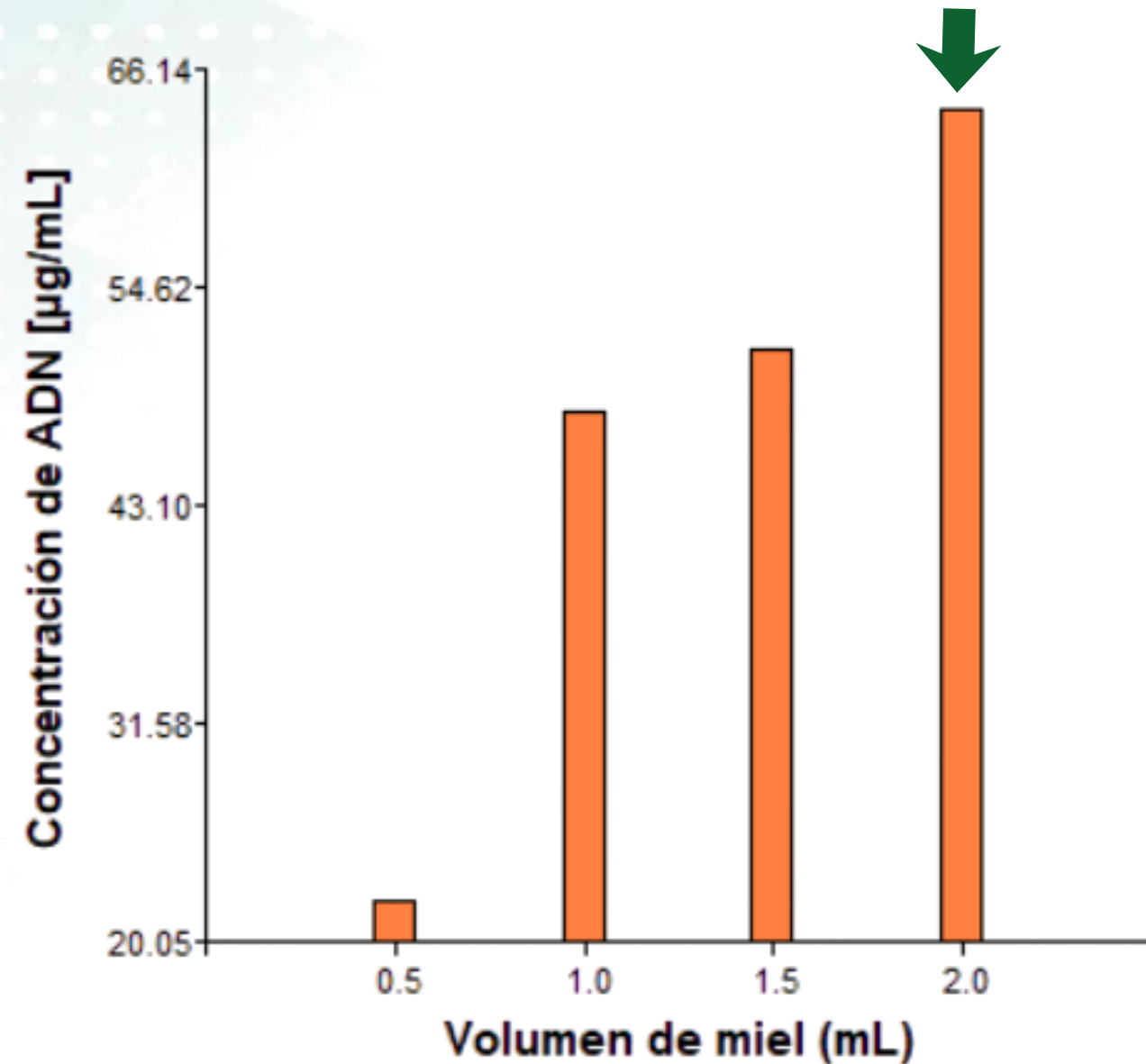
51 %

Muestras totales
recolectadas para el análisis

Estudio que integra géneros menos documentados

- *Tetragona* sp.
- *Ptilotrigona* sp.
- *Nannotrigona* sp.

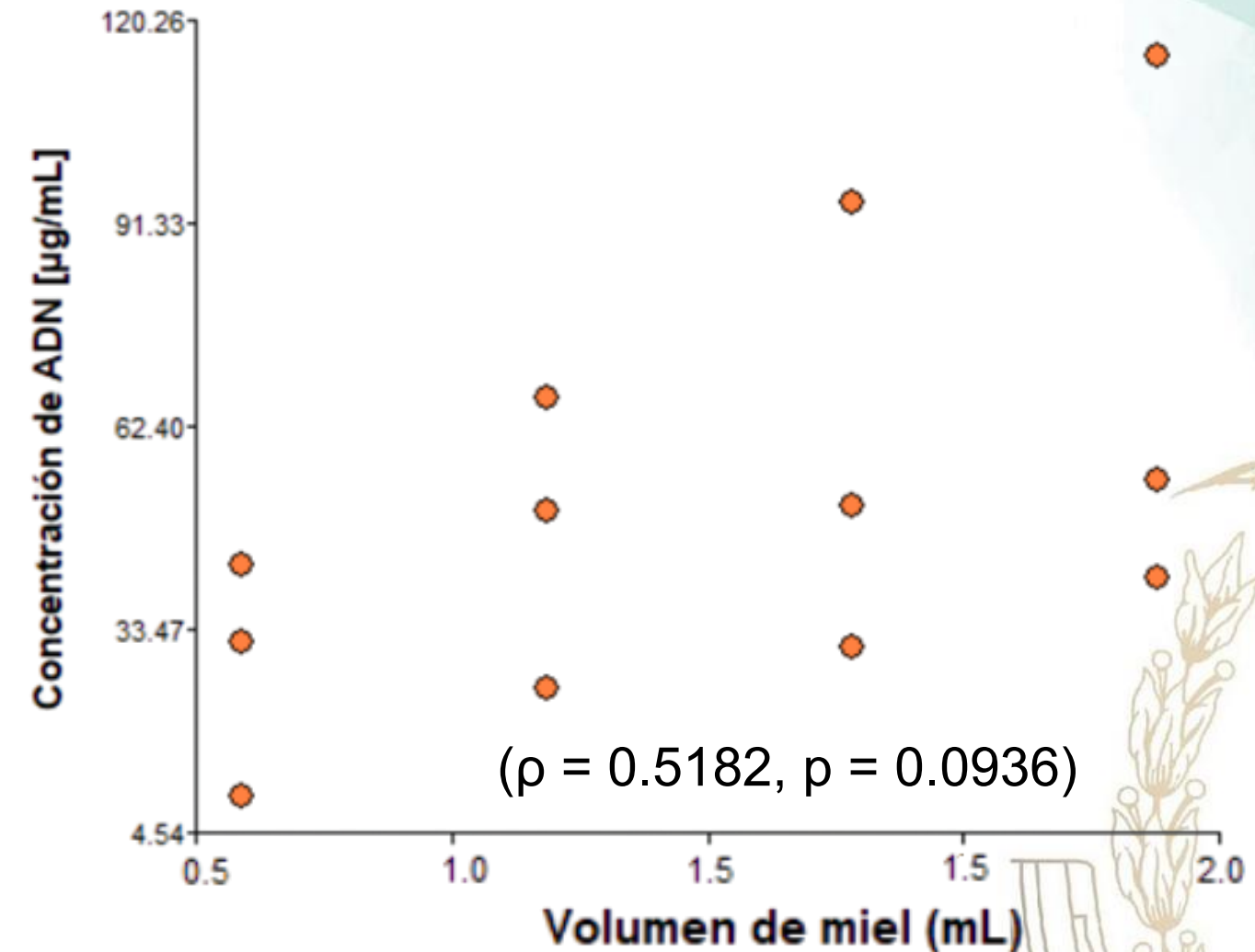
Concentración de biomasa



↑ **Incremento progresivo**

1 ciclo de centrifugación (0.5 mL): $\bar{x} = 22.15 \mu\text{g/ mL}$

4 ciclos de centrifugación (2.0mL): $\bar{x} = 64.05 \mu\text{g/ mL}$



Múltiples pasos de centrifugación

Mejor recuperación celular.

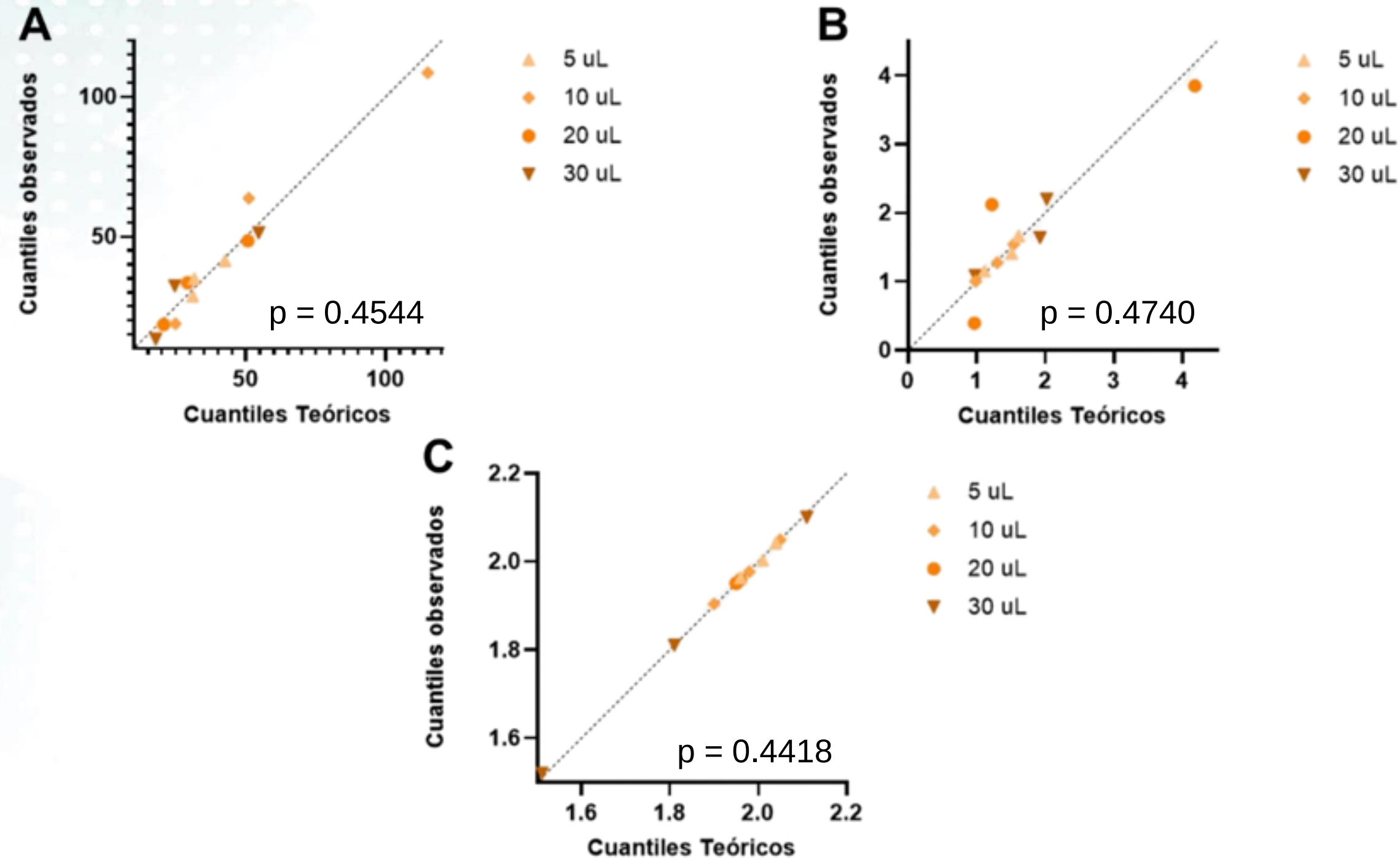


Baja eficiencia de centrifugación

Pérdida celular, limitación cantidad ADN disponible.



❖ Volumen de RNAsa A



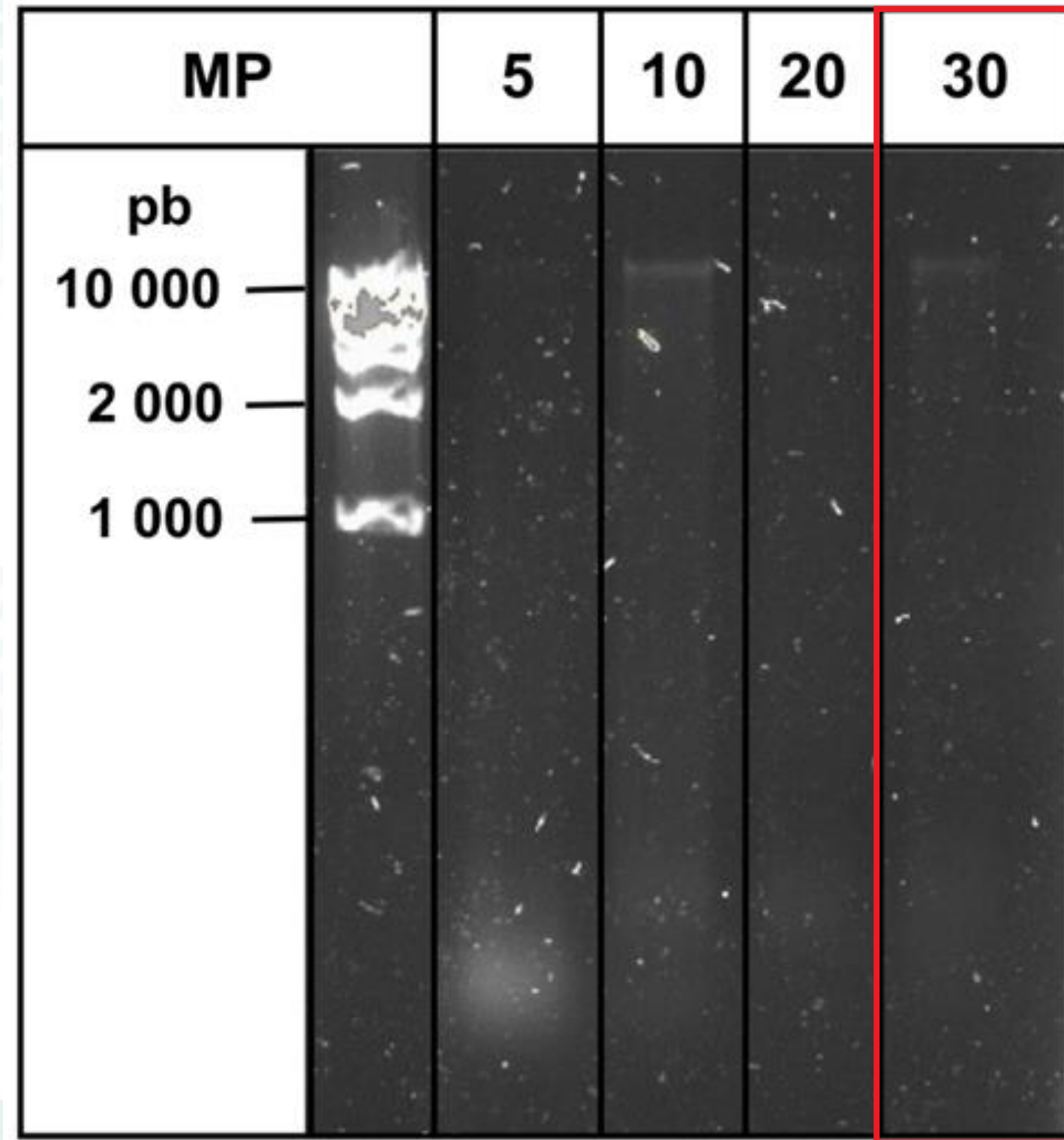
Nota. A: Concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$); B: Índice de pureza 260/230; C: Índice de pureza 260/280

✓ **A260/280**
1.8 -2.0

**No diferencias
entre volumen
de RNAsa A**

**Espectofotometria,
incertidumbre analítica**

► Volumen de RNAsa A



Ánálisis de integridad

Volumen bajo Digestión ARN
incompleta

30 μ L banda de ADN más nítida

► *Tiempo de Incubación*

Tiempo de incubación
muy largo

Degradación del ADN

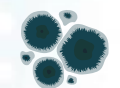


Tiempo de incubación
muy corto

Lisis incompleta



Fuentes de ADN de la miel de abejas sin aguijón



Hongos



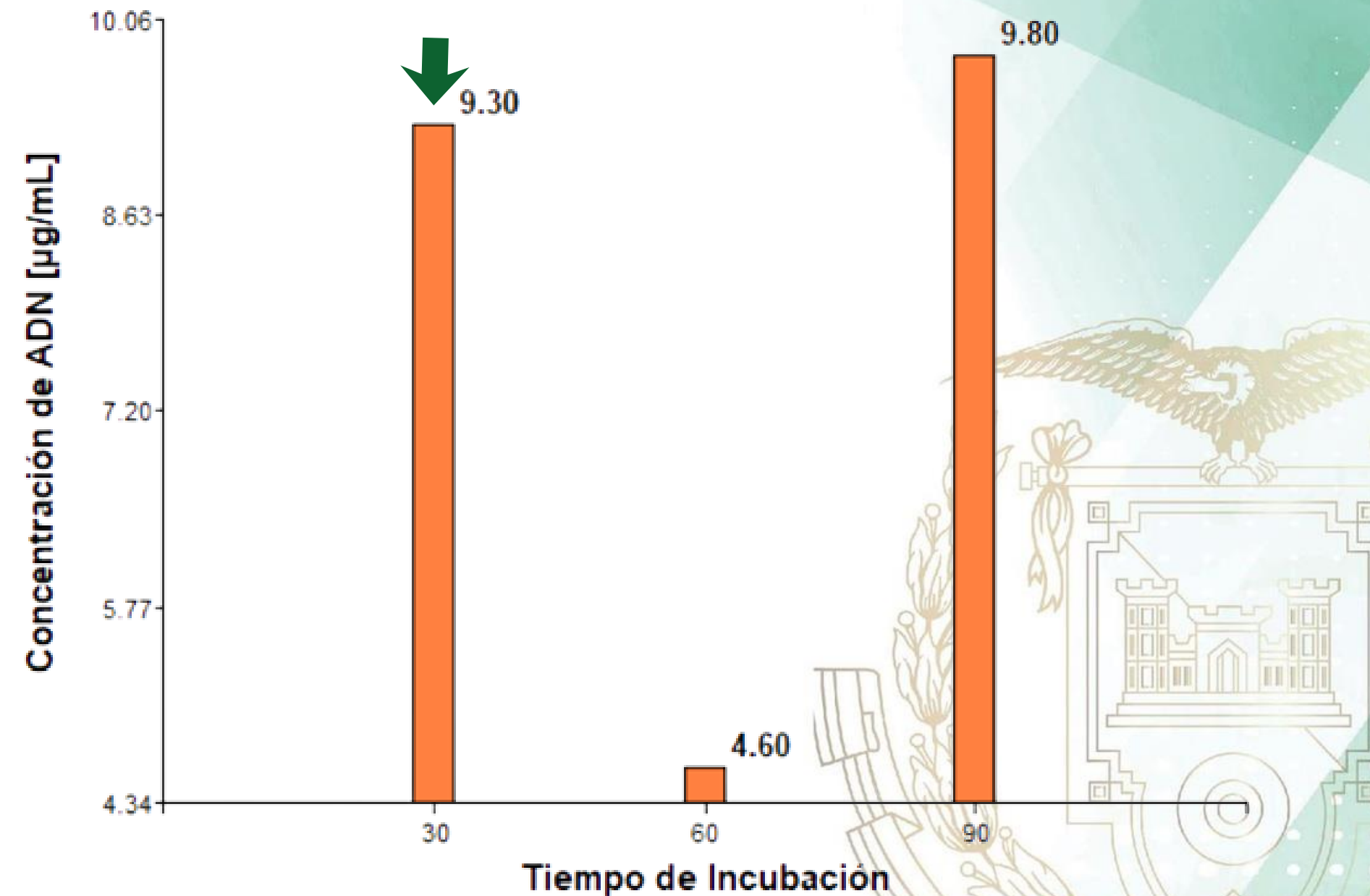
Bacterias



Plantas



Método de extracción
robusto

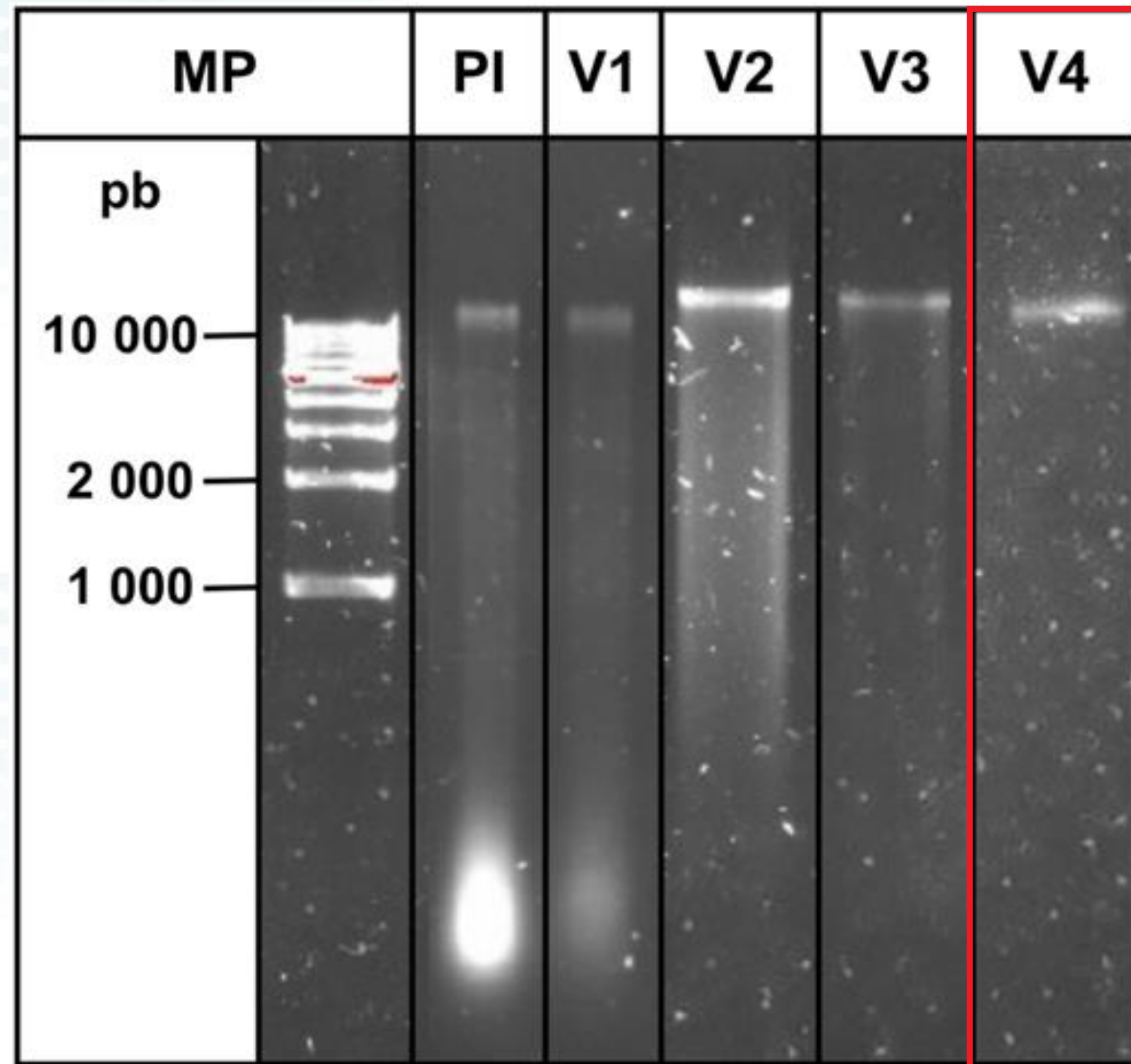


30 minutos



Concentración de ADN similar a la de
protocolo inicial

Validación de modificaciones en la lisis

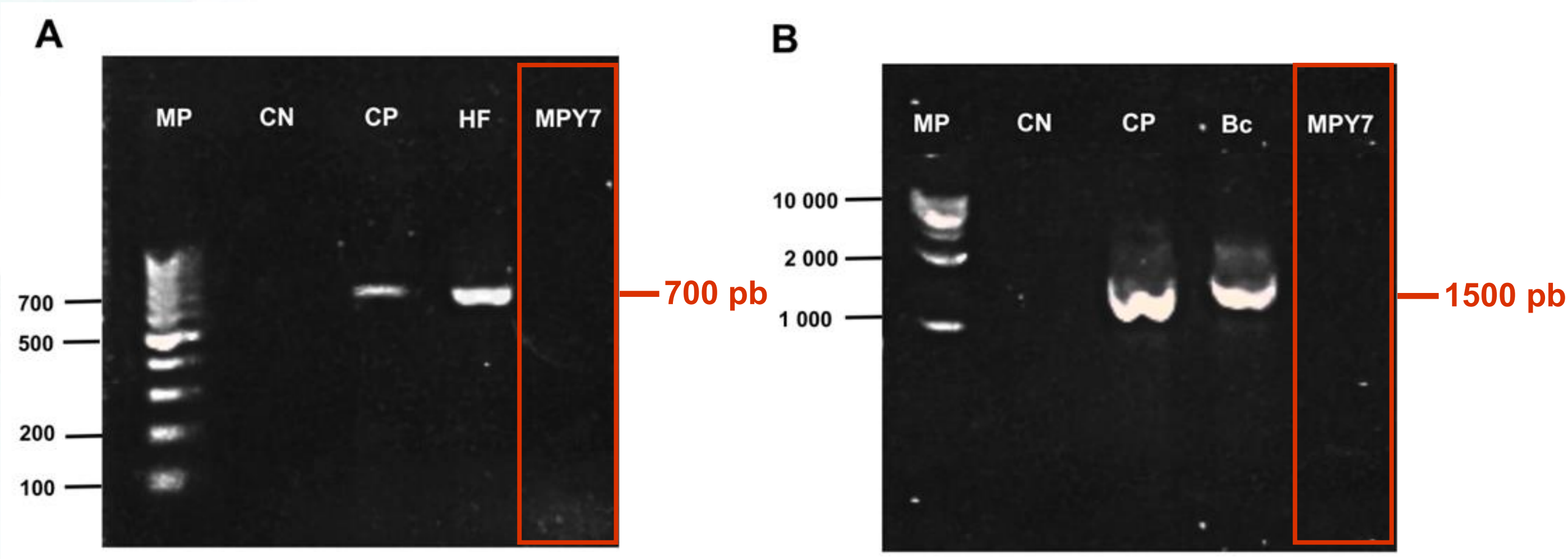


Nota. PI: Protocolo Inicial; V1: Variación 1; V2: Variación 2; V3: Variación 3; V4: Variación 4

Evaluación Integridad del ADN		
PI	Adición simultánea	Degradación (Smear) [$\bar{x}$ = 21.37 $\mu\text{g/mL}$]
V1	RNAsa previo acción PK	
V2	RNAsa previo acción PK Desactivación PK	
V3	RNAsa A posterior precipitación proteínas	Baja recuperación [$\bar{x}$ = 3.7 $\mu\text{g/mL}$]
V4	Acción inicial PK	Banda de ADN integro [$\bar{x}$ = 20.53 $\mu\text{g/mL}$]

Validación Control Positivo

Método de extracción con CTAB robusto



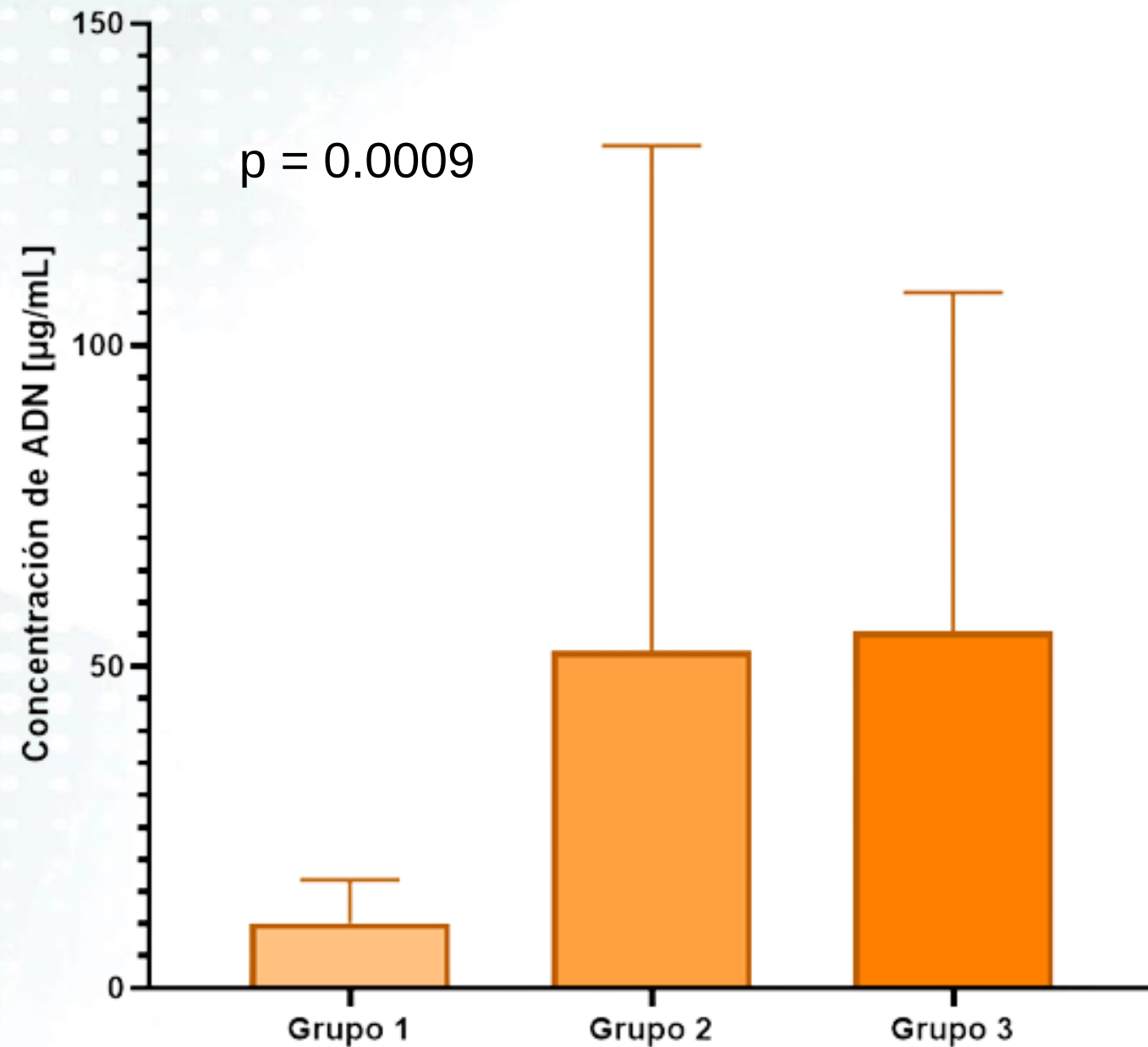
Nota. **A:** Amplificación región ITS, HF: Hongo Filamentoso, MPY7: Miel de *Melipona eburnea*. **B.** Amplificación gen 16s rRNA, Bc: *Bacillus subtilis*, MPY7: Miel de *Melipona eburnea*. Los amplicones mostraron un tamaño de 700 pb y 1 500 pb respectivamente

Ausencia de bandas en muestra de miel

Propiedades fisicoquímicas, inhibidores o ADN diana fragmentado.

◆ Análisis del protocolo estandarizado entre grupos de miel

✓ A260/280
1.8 -2.0



9 - 12 mm



4.5 - 9 mm



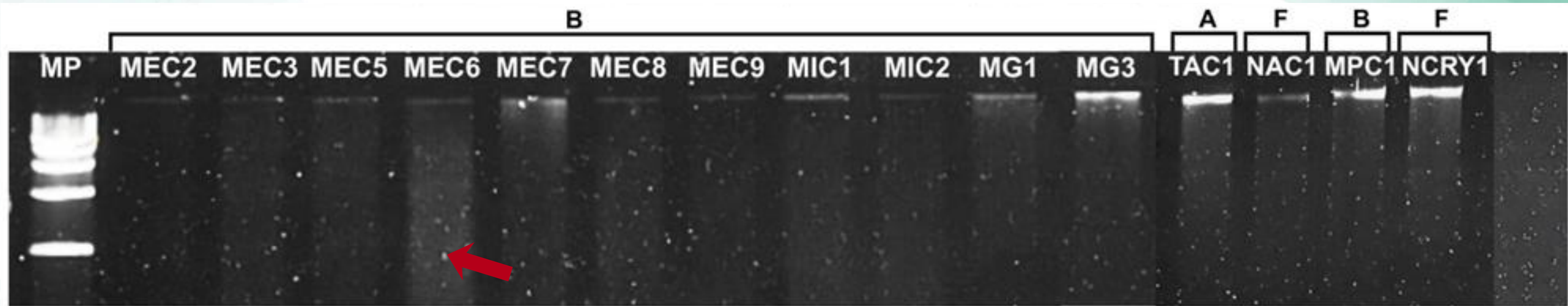
4 - 5 mm

N° Grupo	Media + SD [ADN µg/mL]	Género	Media A260/280
1	10.16 ± 6.71	<i>Melipona sp.</i>	1.93
2	52.40 ± 78.61	Trigonas Robustas	1.93
3	55.54 ± 52.65	Trigonas pequeñas	2.00

Variabilidad entre grupos asociada a los hábitos de forrajeo de cada una de las especies de abejas sin aguijón.

Nota. Grupo 1: *Melipona sp.*, Grupo 2: Trigonas robustas (*Scaptotrigona sp.*, *Tetragona sp.*, *Ptilotrigona sp.*), Grupo 3: Trigonas pequeñas (*Tetragonisca sp.* y *Nannotrigona sp.*)

◆ Análisis del protocolo estandarizado entre grupos de miel

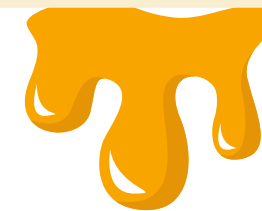


Nota. Los códigos de cada muestra corresponden a mieles de los siguientes géneros: **A.** *Tetragonisca* sp., **B.** *Melipona* sp., **F.** *Nannotrigona* sp.

**Bandas de ADN
integras**



Degradación de ADN



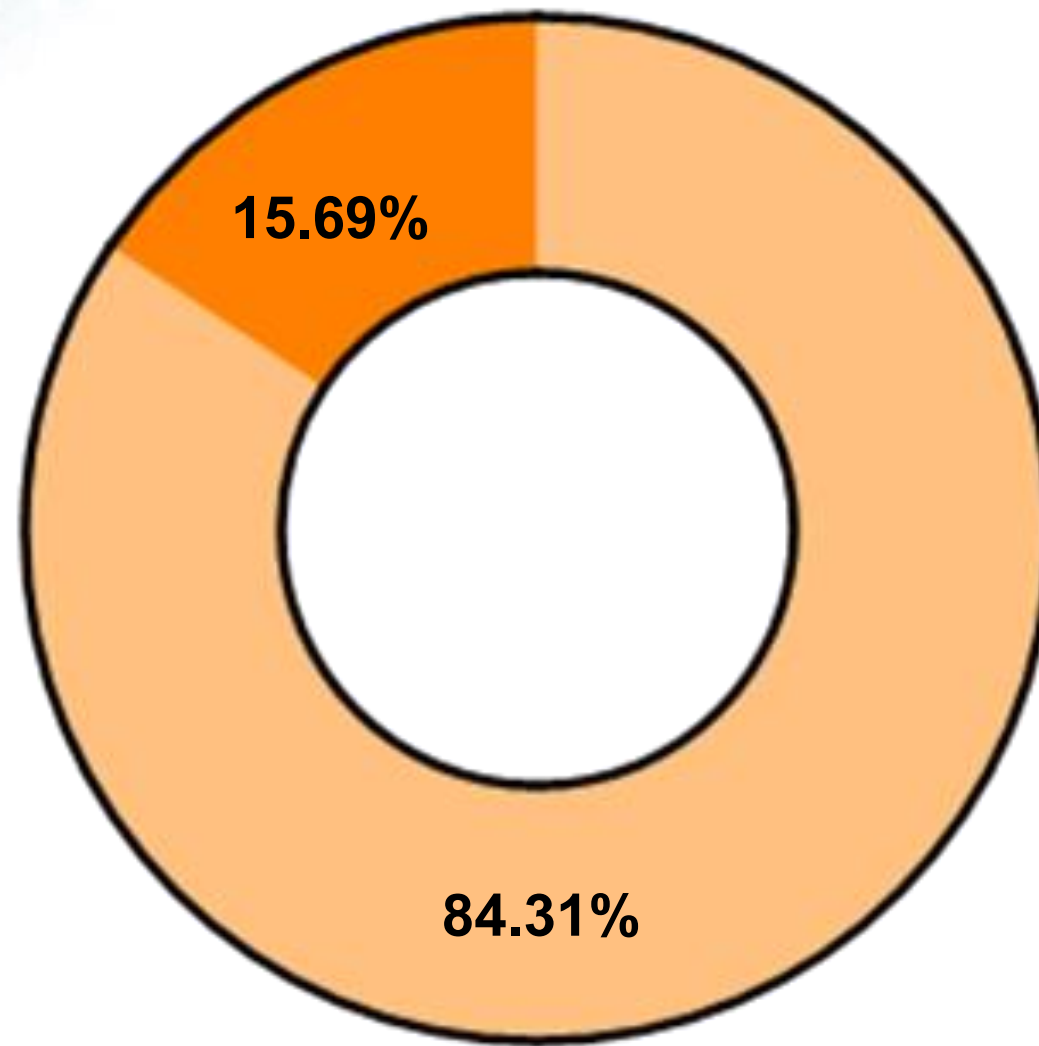
Elevada concentración de
azúcares y compuestos fenólicos
inhiben reacciones enzimáticas

Identificación ADN bacteriano

Amplificación exitosa del gen 16S rRNA

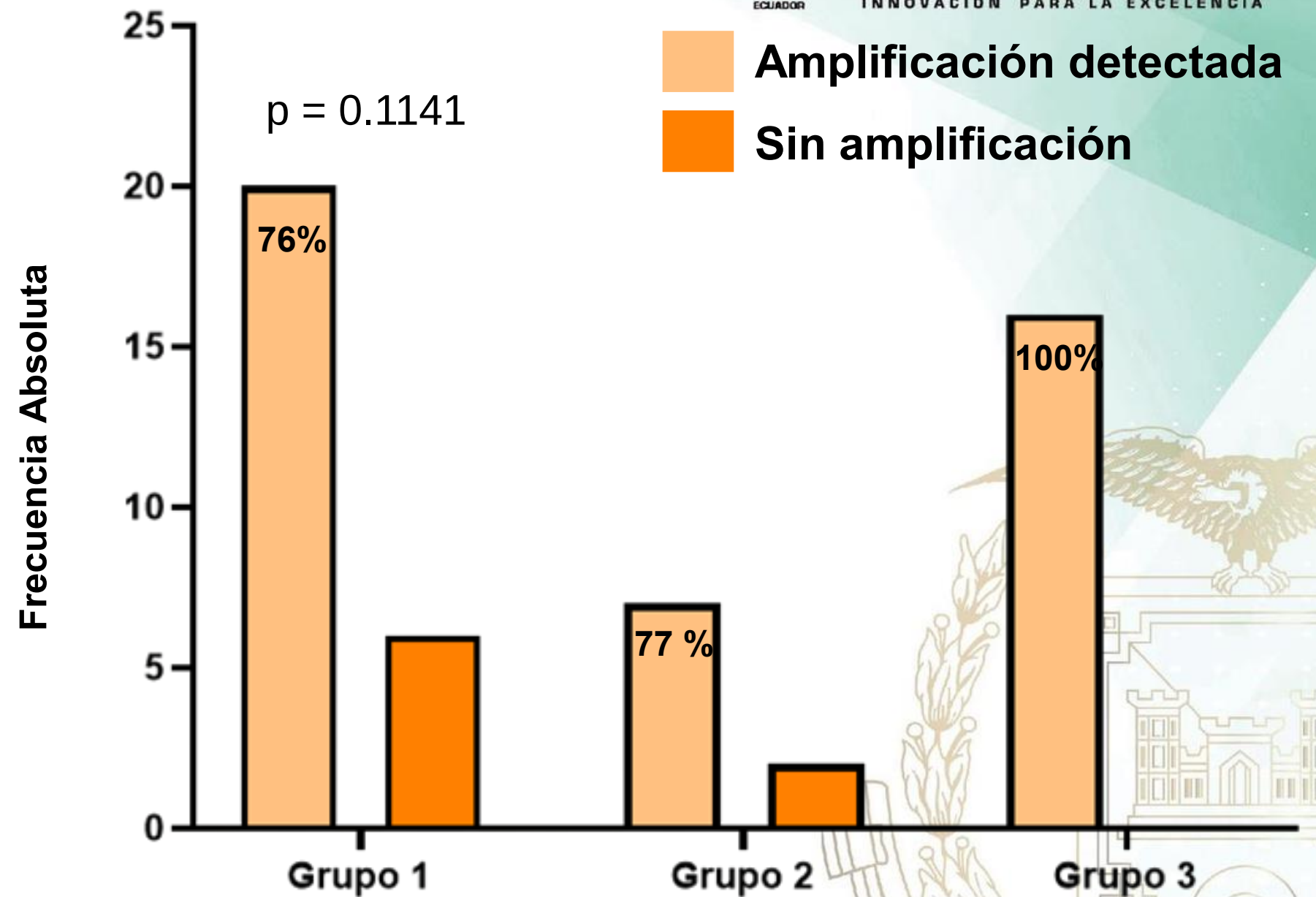


Prevalencia global
43 de 51 = 84.31%



Nota. Grupo 1 (n = 26): *Melipona* sp., Grupo 2 (n = 16): Trigonas robustas (*Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp.), Grupo 3 (n = 9): Trigonas pequeñas (*Tetragonisca* sp. y *Nannotrigona* sp.)

Identificación Firmicutes (*Fructilactobacillus* sp)



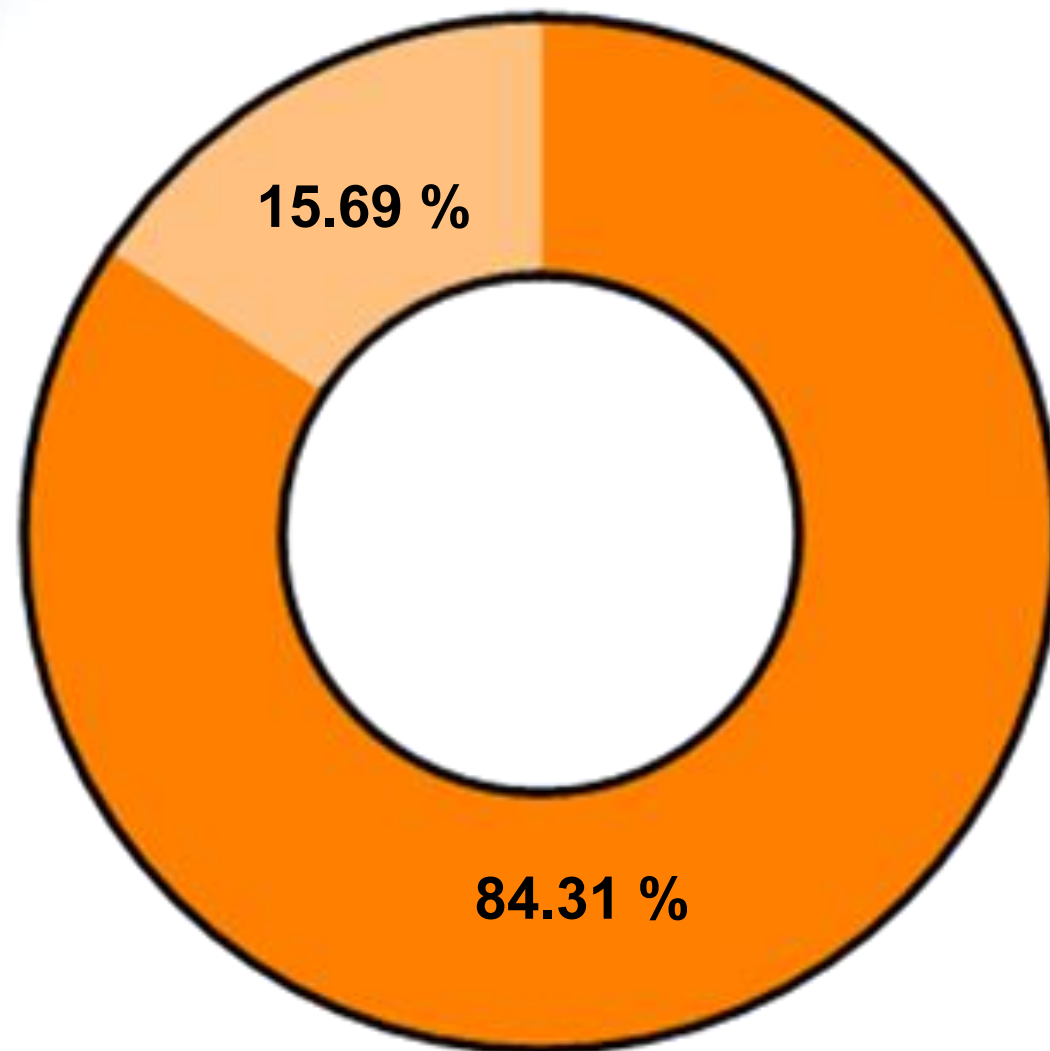
Forrajeo permite adquisición de bacterias

Identificación ADN fúngico

Amplificación exitosa de la región ITS

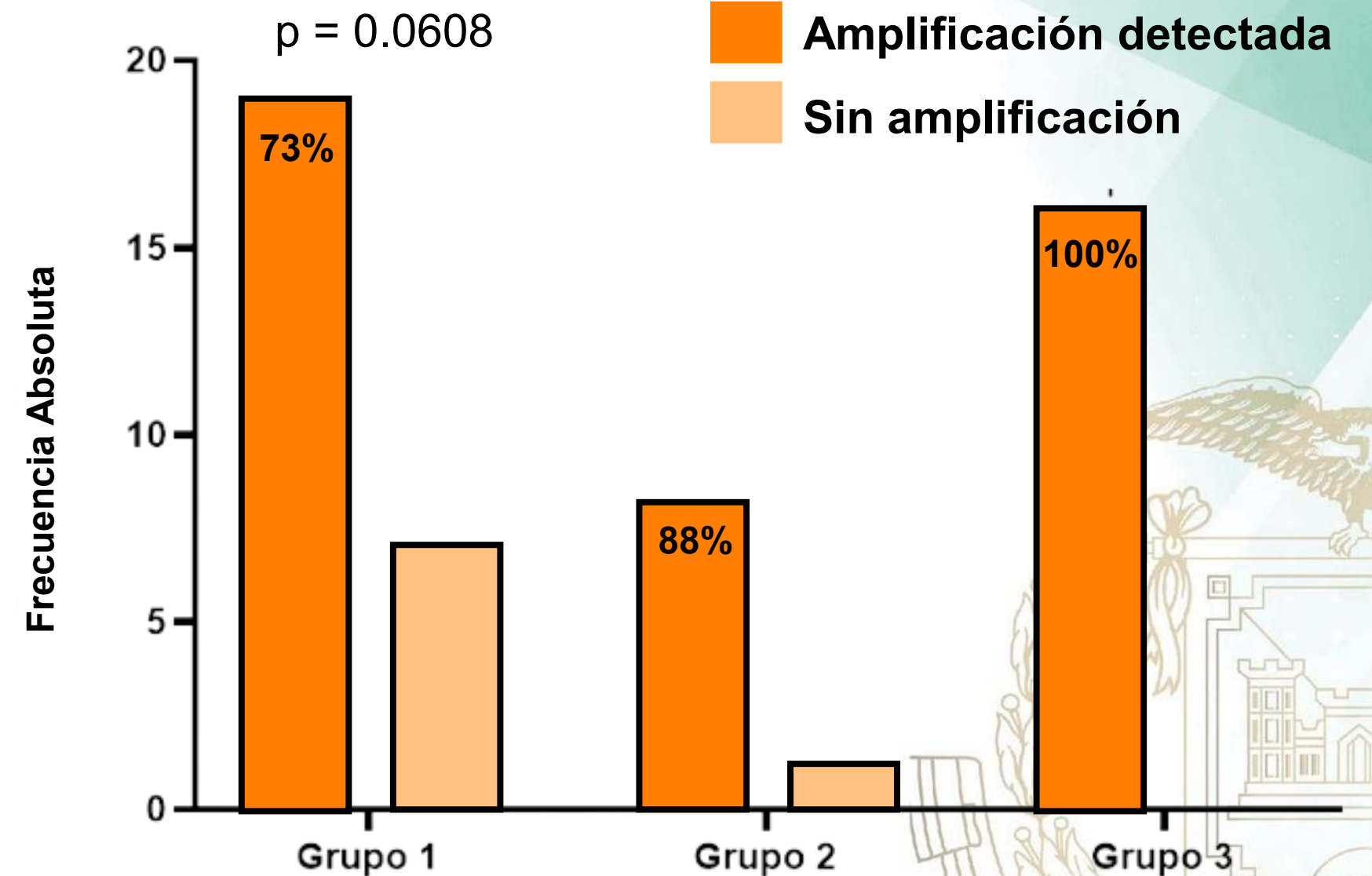


Prevalencia global
43 de 51 = 84.31%



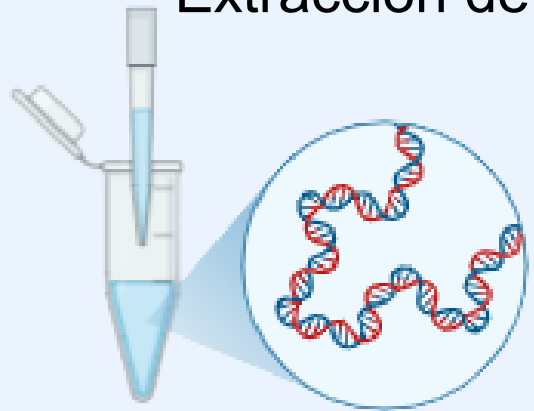
Nota. Grupo 1 (n = 26): *Melipona* sp., Grupo 2 (n = 16): Trigonas robustas (*Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp.), Grupo 3 (n = 9): Trigonas pequeñas (*Tetragonisca* sp. y *Nannotrigona* sp.)

Identificación Hongo Filamentoso (*Monascus* sp.)



Miel es reservorio de microbios

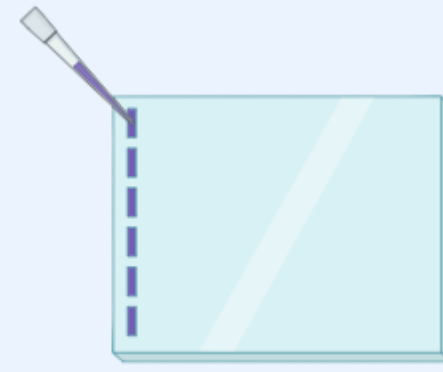
Extracción de ADN



Estudio del microbioma



Modificación de variables



Integridad del ADN

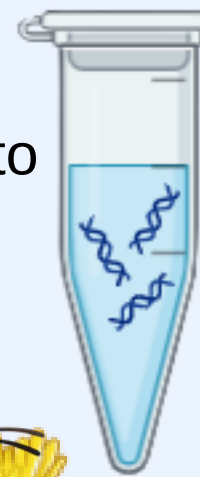


Matriz compleja



Extracción de
ADN

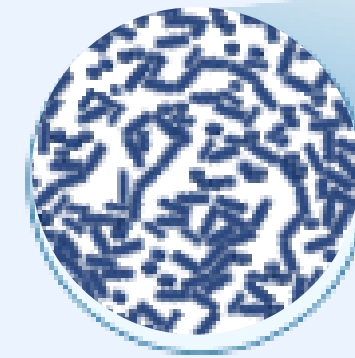
✓ Calidad
Rendimiento



Variabilidad = hábitos de
forrajeo de cada especie.



16S rRNA

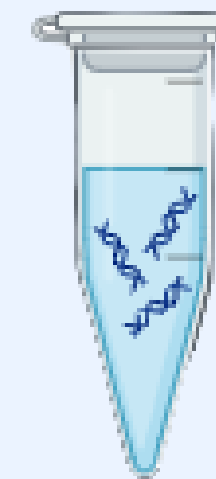
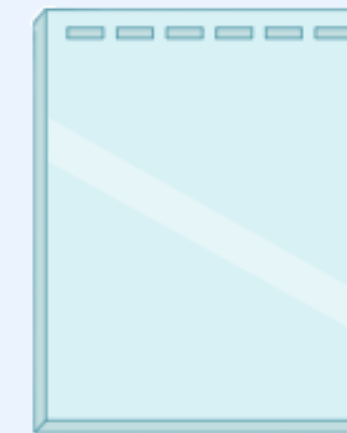


ITS



Reservorio
heterogéneo
de microbios

Ausencia
de bandas



ADN diana
fragmentado

Polyphenol

Glucose



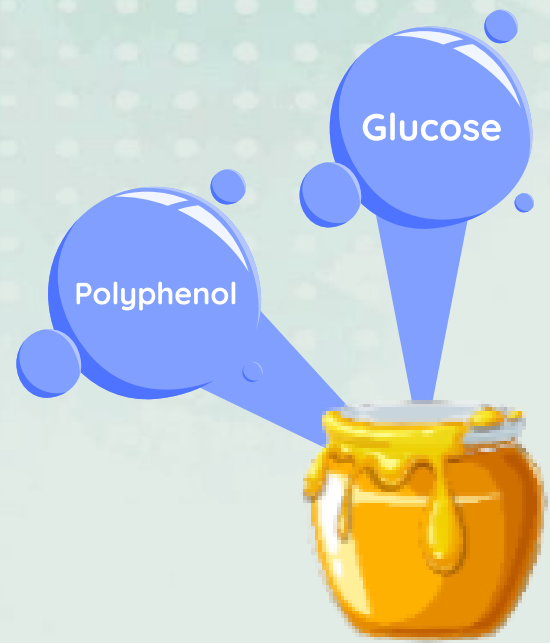
Presencia de
inhibidores

RECOMENDACIONES

25



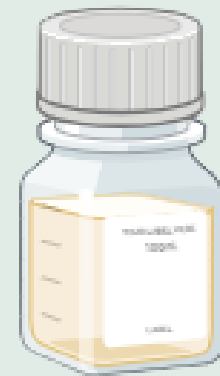
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



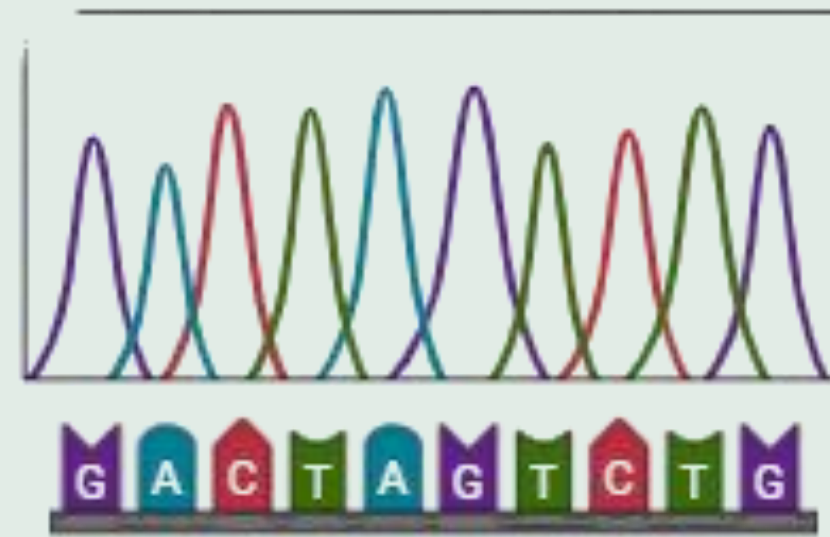
Eliminación
inhibidores



Kits



BSA



Secuenciación



16S rRNA
ITS



Perfil
taxonómico



Enzimas de restricción



Microbioma en miel de
abejas sin aguijón



Análisis molecular



Especies
vegetales



Microbiona
detectado

AGRADECIMIENTOS

Sarah Martin, Ph.D.

Mgrr. Cristina Cholota

Ing. Daniela Yáñez

Mgrr. Claudia Mejía

