



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

Cutiopala Estrada, Doménica Liseth

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

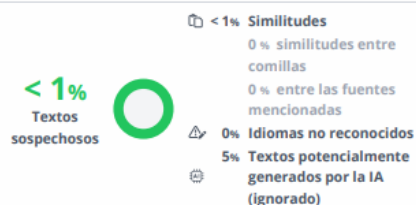
Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Martin Solano, Sarah Ph.D.

25 de febrero de 2026

Trabajo de Integración Curricular_Cutiopala Doménica (1)



Nombre del documento: Trabajo de Integración Curricular_Cutiopala Doménica (1).pdf
 ID del documento: 26faa90dd58c93842b8553eb412b18642fb7cbca
 Tamaño del documento original: 1,46 MB

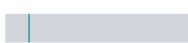
Depositante: SARAH MARTIN SOLANO
 Fecha de depósito: 5/2/2026
 Tipo de carga: interface
 fecha de fin de análisis: 5/2/2026

Número de palabras: 14.380
 Número de caracteres: 98.474

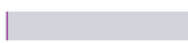
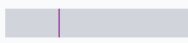
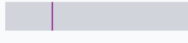
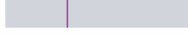
Ubicación de las similitudes en el documento:



Fuente principal detectada

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 expeditiorepositorio.utadeo.edu.co https://expeditiorepositorio.utadeo.edu.co/bitstream/handle/20.500.12010/28026/document... 2 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (22 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 repositorio.espe.edu.ec https://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/36066/T-ESPESD-003278.pdf?s...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (13 palabras)
2	 dx.doi.org Distribución geográfica de las abejas del fuego en Colombia (Hymeno... http://dx.doi.org/10.25100/socolen.v33i2.9342	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (17 palabras)
3	 rinacional.tecnm.mx https://rinacional.tecnm.mx/jspui/bitstream/TecNM/9586/1/TESIS REPOSITORIO LUIS F POOL ...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (13 palabras)
4	 hdl.handle.net Caracterización físico-química y análisis de la capacidad antimicr... https://hdl.handle.net/11441/139379	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (11 palabras)
5	 cienciasagricolas.inifap.gob.mx https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/download/2866/5040?inlin...	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (13 palabras)

Martin Solano, Sarah Ph.D.

Directora



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Implementación de herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en miel de abejas sin aguijón”** fue realizado por la señorita **Cutiopala Estrada, Doménica Liseth**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 25 de febrero de 2026

Martin Solano, Sarah Ph.D.

Directora

C.C.: 1727221721



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cutiopala Estrada, Doménica Liseth**, con cédula de ciudadanía N° **1725529984**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Implementación de herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en miel de abejas sin aguijón”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de febrero de 2026

Cutiopala Estrada, Doménica Liseth

C.C.: 1725529984



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Cutiopala Estrada, Doménica Liseth**, con cédula de ciudadanía **N° 1725529984**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Implementación de herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en miel de abejas sin aguijón”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de febrero de 2026

Cutiopala Estrada, Doménica Liseth

C.C: 1725529984

Dedicatoria

Este trabajo de titulación está dedicado a mis padres: Geovani y Ruth quienes han sido el pilar fundamental en mi vida, gracias por acompañarme en cada paso, por enseñarme con ejemplo y brindarme las herramientas necesarias para convertirme en la persona que soy ahora. Su fe incondicional en mí ha sido mi mayor bendición.

A mi hermano, Andrés por ser mi compañero constante y por iluminar mis días con alegría y amor. Gracias por estar a mi lado alentándome cada día para alcanzar esta meta.

Con todo mi amor y gratitud,

Doménica.

Agradecimiento

Extiendo mi agradecimiento a la Dra. Sarah Martin por permitirme formar parte del Laboratorio de Biotecnología Animal, por ser mi guía y apoyo en el desarrollo las actividades durante mi estancia. Así mismo a la Mgrt. Cristina Cholota por brindarme su tiempo, asesoramiento y paciencia durante el desarrollo de las actividades. Además, a la Mgrt. Claudía Mejía e Ing. Daniela Yáñez por acompañarme con orientación y amistad en cada etapa de esta investigación.

A los amigos que hice durante el camino, gracias por ser mis compañeros de aprendizaje y momentos compartidos. De manera muy especial agradezco a Pame Manyá, Daya Morales, Dianita Torres y Josué Arroba quienes se convirtieron en mis confidentes durante este cierre de etapa. Su apoyo incondicional, sus consejos y su alegría convirtieron este proceso en una experiencia compartida que recordare siempre.

Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma han brindado su apoyo y consejo durante los momentos difíciles y cuya palabra fue importante para terminar con éxito este importante proyecto de vida.

Índice de contenidos

Capítulo I: Introducción y Estado del arte	17
Estado del Arte	17
Introducción	19
Objetivos.....	21
<i>Objetivo General</i>	21
<i>Objetivos Específicos</i>	21
CAPÍTULO II: Marco Teórico.....	21
Tribu <i>Meliponini</i> (Abejas sin aguijón).....	21
<i>Diversidad y distribución</i>	23
<i>Importancia ecológica y económica</i>	24
Productos derivados de las abejas sin aguijón	25
Miel de abejas sin aguijón.....	26
Características fisicoquímicas de miel de abejas sin aguijón	26
<i>Contenido de agua</i>	27
<i>Azúcares reductores</i>	27
<i>pH y acidez</i>	27
<i>Conductividad eléctrica</i>	27
<i>Elementos Minerales</i>	28
<i>Color</i>	28
<i>Hidroximetilfurfural (HMF)</i>	28

<i>Compuestos fenólicos</i>	29
Microbiota asociada a las abejas sin aguijón	29
<i>Microorganismos presentes en la miel</i>	30
<i>Rol de los microorganismos en la miel</i>	31
Métodos para la identificación de microorganismos en miel	31
<i>Extracción de ADN</i>	32
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	33
<i>Marcadores moleculares</i>	34
CAPÍTULO III: Materiales y Métodos	36
Procedencia de las muestras.....	36
Estandarización de un protocolo de extracción.....	40
<i>Procesamiento de las muestras</i>	40
<i>Protocolo de extracción de ADN</i>	41
<i>Cuantificación del ADN</i>	43
<i>Integridad del ADN</i>	44
Análisis Molecular	44
<i>PCR 16S RNA para bacterias</i>	44
<i>PCR ITS para hongos</i>	46
Evaluación de la extracción de ADN de bacterias Gram positivas y Hongos mediante el protocolo de extracción optimizado	48
Análisis estadístico.....	48
CAPÍTULO IV: Resultados	51

	10
Categorización de muestras según el género	51
Estandarización del protocolo de extracción de ADN	52
<i>Concentración de biomasa</i>	52
<i>Optimización volumen de RNAsa A</i>	53
<i>Optimización tiempo de incubación</i>	56
<i>Evaluación de la integridad del ADN: Validación de modificaciones en la lisis</i>	58
Validación del protocolo de extracción para bacterias Gram positivas y hongos	59
Análisis del protocolo optimizado entre grupos funcionales de miel	61
Determinación de la presencia de microorganismos mediante análisis molecular	68
<i>Identificación ADN bacteriano</i>	69
<i>Identificación ADN fúngico</i>	72
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones	76
Conclusiones	76
Recomendaciones	77
Capítulo VI: Referencias	78

Índice de tablas

Tabla 1	Identificación de las muestras de miel en nidos de abejas sin aguijón	37
Tabla 2	Variaciones exploradas en base al protocolo de Ribani et al., (2020) y Utzeri et al., (2018).....	42
Tabla 3	Secuencia primers 27F y 1472R	44
Tabla 4	Volumen de reactivos para la mezcla de reacción.....	45
Tabla 5	Condiciones de amplificación	45
Tabla 6	Secuencia primers ITS1F e ITS4.....	46
Tabla 7	Volumen de reactivos para la mezcla de reacción.....	46
Tabla 8	Condiciones de amplificación	47
Tabla 9	Pruebas estadísticas para el análisis de datos	49
Tabla 10	Valores media y desviación estándar de las tres variables según el volumen de la enzima RNAsa A.....	56
Tabla 11	Resumen de las modificaciones realizadas en el protocolo inicial	61
Tabla 12	Resultados de la cuantificación de ADN extraído en miel de abejas sin aguijón de los géneros <i>Melipona sp.</i> , <i>Scaptotrigona sp.</i> , <i>Tetragona sp.</i> , <i>Ptilotrigona sp.</i> , <i>Tetragonisca sp.</i> , y <i>Nannotrigona sp.</i>	62
Tabla 13	Medias de los índices de pureza 260/230 y 260/280 según grupos de mieles de abejas sin aguijón	67

Índice de Figuras

Figura 1	Estructura de un nido subterráneo de abejas sin aguijón	22
Figura 2	Procedencia geográfica de muestras de miel de abejas sin aguijón	37
Figura 3	Clasificación porcentual de muestras de miel de abejas sin aguijón según el género.	51
Figura 4	Correlación ciclos de centrifugación – concentración de ADN.....	53
Figura 5	Evaluación cualitativa del volumen RNAsa A	54
Figura 6	Supuestos de normalidad para las variables según el volumen de RNAsa A	55
Figura 7	Evaluación tiempos de incubación.....	57
Figura 8	Evaluación de la integridad del ADN: Variación en la lisis	59
Figura 9	Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS y del gen 16S rRNA	60
Figura 10	Valores de la media y desviación estándar de la concentración de ADN entre grupos de miel de abejas sin aguijón: <i>Melipona</i> sp., Trigonas robustas y Trigonas pequeñas..	65
Figura 11	Supuestos de normalidad para las variables según la agrupación de géneros de abejas sin aguijón	66
Figura 12	Gel de integridad de miel de abejas sin aguijón de los géneros <i>Melipona</i> sp., <i>Scaptotrigona</i> sp., <i>Tetragona</i> sp., <i>Ptilotrigona</i> sp. <i>Tetragonisca</i> sp., y <i>Nannotrigona</i> sp	68
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa del gen 16S rRNA	70
Figura 14	Prevalencia de la amplificación del gen 16s rRNA en muestras de ADN extraído a partir de miel de abejas sin aguijón de los géneros <i>Melipona</i> sp., <i>Scaptotrigona</i> sp., <i>Tetragona</i> sp., <i>Ptilotrigona</i> sp. <i>Tetragonisca</i> sp., y <i>Nannotrigona</i> sp.	70
Figura 15	Prevalencia de la amplificación del gen 16s rRNA en grupos de miel de abejas sin aguijón.....	71
Figura 16	Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS.....	73

Figura 17 Prevalencia de la amplificación de la región ITS en muestras de ADN extraído a partir de miel de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona sp.*, *Scaptotrigona sp.*, *Tetragona sp.*, *Ptilotrigona sp.*, *Tetragonisca sp.*, y *Nannotrigona sp.* 74

Figura 18 Prevalencia de la amplificación de la región ITS en grupos de miel de abejas sin aguijón..... 75

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Tris – HCl	Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano
NaCl	Cloruro de sodio
TBE	Tris-Borato-EDTA
kb	Kilobase
pb	Par de base
RNAse A	Ribonucleasa A
pH	Potencial hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ITS	Espaciador transcrito interno
16S rRNA	ARN ribosómico 16S
sp.	Especie
BSA	Albúmina Sérica Bovina
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
μL	Microlitros
mL	Mililitros
μg/mL	Microgramos por cada mililitro

μM	Micromolar
mM	Milimolar
U/ μL	Unidad por cada microlitro
Ngr	Nanogramos
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celcius
km	Kilometro
mm	Milímetro
n	Tamaño de la muestra
RPM	Revoluciones por minuto
RCF	Fuerza centrífuga relativa

Resumen

La miel de abejas sin aguijón alberga un microbioma diverso proveniente del tracto digestivo de la abeja, néctar, polen, flores y alrededores del nido. En este sentido, la caracterización del microbioma de miel se ha centrado en métodos tradicionales basados en cultivo que presentan limitaciones. Puesto que, alrededor del 99% de especies microbianas no son cultivables. Por ello, el objetivo del presente estudio fue implementar herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en ADN extraído a partir de miel de abejas sin aguijón. Debido al alto contenido de polisacáridos, polifenoles y ácidos orgánicos que interfieren en aplicaciones moleculares, se optimizó un protocolo de extracción basado en CTAB. Las modificaciones incluyeron ajuste de ciclos de centrifugación, volumen de RNAsa A, tiempo de incubación y secuencia de adición de enzimas durante la lisis. El protocolo optimizado se aplicó a 51 muestras de miel de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona sp.*, *Scaptotrigona sp.*, *Tetragona sp.*, *Ptilotrigona sp.*, *Tetragonisca sp.*, y *Nannotrigona sp.* El rendimiento y la calidad del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa, confirmando la obtención de ADN de alto peso molecular, con valores de concentración de ADN similares a los previamente reportados y datos de pureza 260/280 dentro del rango óptimo para todas las muestras analizadas. Así mismo, la presencia de ADN bacteriano y fúngico se confirmó tras la amplificación de gen 16S rRNA y la región ITS, respectivamente. La amplificación para ambos marcadores moleculares fue exitosa en el 84.31% de las muestras.

Palabras clave: Miel de abejas sin aguijón, microbioma, extracción de ADN, 16S rRNA, ITS.

Abstract

Stingless bee honey harbors a diverse microbiome originating from the bee's digestive tract, nectar, pollen, flowers, and the nest surroundings. In this sense, the characterization of the honey microbiome has focused on traditional culture-based methods that present limitations, since around 99% of microbial species are unculturable. Therefore, the objective of the present study was to implement molecular tools for the identification of microorganisms in DNA extracted from stingless bee honey. Due to the high content of polysaccharides, polyphenols, and organic acids that interfere with molecular applications, a CTAB-based extraction protocol was optimized. Modifications included adjustment of centrifugation cycles, RNase A volume, incubation time, and the sequence of enzyme addition during lysis. The optimized protocol was applied to 51 honey samples from the genera *Melipona sp.*, *Scaptotrigona sp.*, *Tetragona sp.*, *Ptilotrigona sp.*, *Tetragonisca sp.*, and *Nannotrigona sp.* The yield and quality of the extracted DNA were evaluated by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis, confirming the obtaining of high-molecular-weight DNA, with DNA concentration values similar to those previously reported and 260/280 purity data within the optimal range for all samples analyzed. Likewise, the presence of bacterial and fungal DNA was confirmed after the amplification of the 16S rRNA gene and the ITS region, respectively. Amplification for both molecular markers was successful in 84.31% of the samples.

Key words: Stingless bee honey, microbiome, DNA extraction, 16S rRNA, ITS.

Capítulo I: Introducción y Estado del arte

Estado del Arte

A nivel mundial, las abejas cumplen un papel fundamental en el medio ambiente al favorecer la polinización de especies vegetales tanto en ecosistemas naturales (Katumo et al., 2022) como en cultivos agrícolas (Nicholls & Altieri, 2013). En el mundo existen más de veinte mil especies de abejas pertenecientes a la familia Apidae (Vossler, 2019). La familia Apidae contiene varias tribus: *Apini*, *Bombini*, *Euglossini*, *Meliponini* y otras menos conocidas (Arnold et al., 2018). Así, las tribus *Apini* (abejas melíferas) y *Meliponini* (abejas melíferas sin aguijón) son reconocidas como taxones de abejas eusociales avanzadas (Toledo et al., 2022).

Las abejas sin aguijón forman colonias donde grupos de individuos cumplen una función especializada (Arnold et al., 2018). En la colonia decenas de obreras se encargan del forrajeo, defensa del nido (Rajasekhar et al., 2017) y cuidado de las crías (Rutter, 2022). Una cantidad variable de machos son responsables de la fecundación y generalmente una sola reina es la encargada de poner huevos para mantener o aumentar la población (Roller, 2024). Por ello, se consideran las más eusociales entre las abejas nativas de los trópicos y subtrópicos (Toledo et al., 2022). Así mismo, las abejas sin aguijón tienen la necesidad de visitar las flores en busca de néctar y polen para alimentarse (Bueno et al., 2023), y más adelante son almacenados para la producción de miel.

La miel de abeja sin aguijón también conocida como miel de pote es un producto muy valorado debido a que posee propiedades nutritivas, terapéuticas y medicinales benéficas para la salud humana (Gadge et al., 2024; Toledo et al., 2022). La principal diferencia entre la miel producida por abejas de la tribu *Apini* y miel de abejas sin aguijón, es que la miel de la tribu *Apini* es resultado de la deshidratación del néctar (De Paula et al., 2021). Mientras que, la obtención y conservación de la miel de abejas sin aguijón depende sobre todo de la fermentación por microbios simbioses (Menezes et al., 2013).

Cano et al., (1994) ha demostrado que la estrecha relación entre las abejas y los microorganismos es incuestionable, lo que se refleja en el microbioma diverso de la miel. La mayoría de microorganismos en la miel se originan a partir del polen, suelo, aire, flores, polvo y tracto digestivo de las abejas (Snowdon & Cliver, 1996). Además, ciertos contaminantes microbianos secundarios pueden encontrarse en la miel como resultado de la manipulación humana (Olaitan et al., 2007).

Típicamente, la identificación de microorganismos en la miel se ha centrado en aislar bacterias y hongos cultivables sujetos a sesgo por la naturaleza del método (Anderson et al., 2013). Por lo tanto, el uso de métodos independientes al cultivo como el análisis molecular que incluye extracción de ADN y amplificación mediante PCR ha permitido conocer de forma más completa el microbioma de miel de abejas de la tribu *Apini* (Anderson & Copeland, 2024; Xiong et al., 2023). En contraste, en menor cantidad se conoce el microbioma de la miel de abejas de la tribu *Meliponini* (Da Silva et al., 2024).

Introducción

La miel de abeja sin aguijón se caracteriza por tener un sabor distintivo y un gusto ácido en comparación con la miel de abejas melíferas, principalmente la producida por la especie *Apis mellifera* (Esa et al., 2022). En la actualidad, existe mayor interés en la cría de abejas sin aguijón (meliponicultura) dentro de las comunidades rurales e indígenas de países tropicales como el Ecuador. El objetivo de su cuidado es satisfacer la alta demanda de miel cruda (Esa et al., 2022), productos a base de miel (Zulhendri et al., 2022) y su conservación (Cholotío et al., 2024).

Se ha revelado que la miel de abeja sin aguijón exhibe propiedades antioxidantes (Suntiparapop et al., 2012), antidiabéticas (Ali et al., 2020), antiinflamatorias (Badrulhisham et al., 2020). A pesar de ello, la cantidad de agua relativamente abundante en la miel permite que microorganismos sobrevivan y se mantengan activos lo que puede influir en su calidad,

propiedades funcionales e inocuidad (Sanz et al., 1995). En este sentido, se han realizado diversos estudios sobre la composición fisicoquímica y nutricional de la miel de abeja sin aguijón (Begna et al., 2024; Nascimento et al., 2015; Nordin et al., 2018), pero hasta el momento se conoce poco sobre su diverso microbioma.

El estudio del microbioma se ha centrado primordialmente en mieles de *Apis mellifera* utilizando métodos tradicionales para aislar e identificar bacterias y hongos en medios de cultivo. Sin embargo, evidencian deficiencias notables (Snowdon & Cliver, 1996), puesto que, más del 99% de especies microbianas no son cultivables y menos del 1% si lo son, lo cual no es representativo de la diversidad microbiana total (Pham & Kim, 2012; Xiong et al., 2023).

Por esta razón, surge la necesidad de estandarizar métodos moleculares que permitan la caracterización total del ADN bacteriano y fúngico en mieles de abejas sin aguijón.

Así mismo, al evaluar la diversidad microbiana en miel de abejas sin aguijón por medio de la detección de ADN bacteriano y fúngico utilizando el método de metabarcoding del gen 16S rRNA y la región ITS es importante (Xiong et al., 2023). Los datos obtenidos a partir de la amplificación con los marcadores 16S rRNA e ITS reflejan el conjunto total de microorganismos presentes, así como, las interacciones entre el individuo y el medio ambiente e indican la salud general del nido (Engel et al., 2016; Raymann & Moran, 2018).

De la misma forma, la comprensión de la dinámica microbiana contribuye a la mejora en la producción de miel (Alves et al., 2024), la prevención de enfermedades en las abejas (Anderson et al., 2013) y el fortalecimiento de la meliponicultura como actividad sostenible (Cerqueira et al., 2024) .

Debido al creciente interés y demanda de productos derivados de la miel de abeja sin aguijón se ha resaltado la necesidad de producir estándares alimentarios que permitan establecer la autenticidad y procedencia del producto. Para el Ecuador el estudio del

microbioma en miel de abejas sin aguijón representa una oportunidad de innovación biotecnológica con mejora en la calidad de productos apícolas y generación de conocimiento que podrá ser transferido a comunidades productoras de miel promoviendo así un desarrollo económico y social inclusivo.

Objetivos

Objetivo General

Implementar herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en miel de abejas sin aguijón

Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN de miel de abejas sin aguijón.
- Determinar la presencia de ADN bacteriano en muestras de miel de abeja.
- Determinar la presencia de ADN fúngico en muestras de miel de abeja.

CAPÍTULO II: Marco Teórico

Tribu *Meliponini* (Abejas sin aguijón)

Las abejas sin aguijón que pertenecen a la tribu *Meliponini*, son un grupo de himenópteros de la familia *Apidae* (Hrncir et al., 2016). Las abejas sin aguijón tienen características morfológicas que las separan de otros grupos. Por ejemplo: el tamaño de las abejas sin aguijón oscila entre 13.5 a 18 mm lo que las hace más pequeñas que *Apis mellifera* (Arnold, 2020). Otra característica es la presencia de una venación alar débil (Bogo et al., 2025). Finalmente, las abejas macho carecen totalmente de un aguijón, mientras que, en las abejas hembras el aguijón es un ovopositor modificado (de Camargo, 2013).

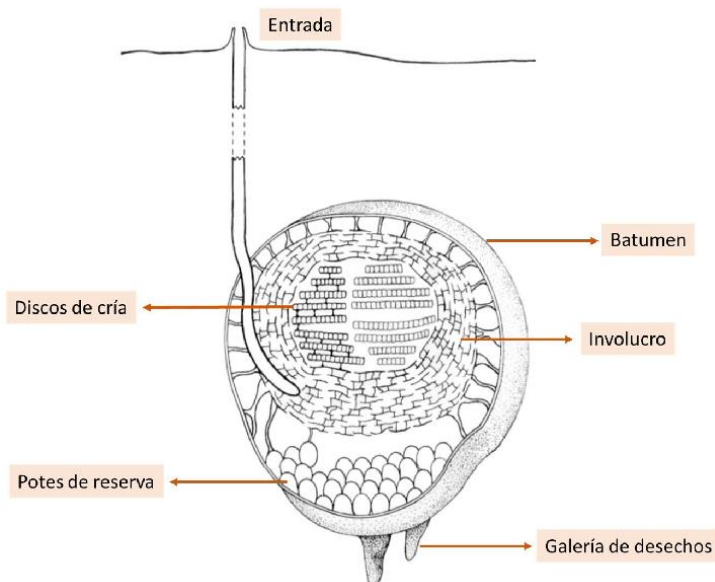
En este sentido, la falta de aguijón funcional les ha permitido desarrollar otras estrategias de defensa, como el ataque (Shackleton et al., 2015), el retiro inmediato o adaptaciones especiales en el nido (Arnold, 2020). El ataque puede incluir mordeduras, por ejemplo, las abejas obreras del género *Oxytrigona* poseen glándulas mandibulares que secretan ácido fórmico, así, al morder depositan una gota de esta secreción sobre la piel y dejan una herida similar a una quemadura (Lindauer, 1976; Roubik et al., 1987). Por otro lado, las adaptaciones en el nido se dan con el cierre y colocación de resina en la entrada del mismo o la presencia de individuos guardianes (Venturieri, 2014). La especie *Tetragonisca angustula* tiene dos tipos diferentes de guardianes, el primero se para sobre, dentro o cerca de la entrada del nido, mientras que, el segundo revolotea cerca para la protección del nido (Arnold, 2020; Grüter et al., 2011).

Los nidos silvestres de esta familia de abejas sin aguijón suelen ser en cavidades preexistentes dentro de maderas (Reinhard et al., 2023), paredes de casas (Macedo et al., 2020), ramas, o troncos de árboles que no son creados sino adaptados para vivir (Bogo et al., 2025). Además, algunas especies, anidan bajo tierra en nidos abandonados por otros insectos sociales, como hormigas o termitas (Layek & Karmakar, 2025). En este sentido, la estructura

interna de sus nidos es más compleja (*Figura 1*), estos están formados por discos con celdas de cría rodeados por capas de cera – resinas (involucro), potses para almacenar reservas de alimento y una capa protectora exterior denominada batumen (Grimaldi et al., 2021).

Figura 1

Estructura de un nido subterráneo de abejas sin aguijón



Nota. Tomado de Grimaldi et al., (2021)

Finalmente, las abejas sin aguijón presentan un comportamiento eusocial avanzado, es decir, son animales en cuya colonia habitan más de una generación superpuesta, existe un cuidado cooperativo de la cría y una división de trabajo según el grupo de individuos (Arnold, 2020). En el nido la reina es la única hembra reproductora capaz de poner huevos femeninos, los machos son responsables del apareamiento con la reina y las obreras se encargan de buscar alimento, proteger la colonia y cuidar a las crías (Bueno et al., 2023).

Diversidad y distribución

Las abejas sin aguijón son reconocidas como el grupo más grande de abejas eusociales en la tierra (Hrncir et al., 2016). Con más de 500 especies descritas superan a las abejas

melíferas (*Apidae*, *Apini*: 11 especies) e incluso comprenden el doble del número de especies de abejorros identificados (*Apidae*, *Bombini*: 250 especies) (Michener, 2007).

Su distribución tropical y subtropical en los hemisferios del mundo sugiere que las abejas sin aguijón tuvieron su origen en el antiguo continente Gondwana hace más de cien millones de años (Camargo & Pedro, 1992). Hoy en día, la mayor biodiversidad de abejas sin aguijón se encuentra en la región Neotropical, desde México hasta Argentina existen unas 400 especies agrupadas en distintos géneros, entre ellos: *Scaptotrigona*, *Nannotrigona*, *Melipona* y *Plebeia* (Arnold, 2020; García et al., 2015).

No obstante, esta diversidad no parece estar distribuida de forma uniforme, más bien se concentra en los llamados *hotspots* o zonas con alta diversidad como los Andes tropicales (García et al., 2015). En Ecuador, se conoce que este grupo alcanza un gran número de especies por área, aproximadamente, 13 veces más especies por área que en Brasil (Moure et al., 2007). Sin embargo, el conocimiento es limitado, por lo que se desconoce el número exacto de especies en el país; hasta 2018 Vit et al, reportó un total de 132 especies distribuidas en 23 géneros y 24 provincias del Ecuador.

Importancia ecológica y económica

Las abejas sin aguijón son esenciales para la salud de los ecosistemas (Vaidya et al., 2023), la diversidad ecológica (Hrncir et al., 2016), la reproducción de las plantas (Dymond et al., 2021) y la seguridad alimentaria (Karuppaiah et al., 2024). Similar a las abejas melíferas, las abejas de la tribu Meliponini desempeñan un papel fundamental en la polinización de especies vegetales en ecosistemas silvestres y cultivados (Bogo et al., 2025). Por ejemplo, la vainilla una especie de planta del grupo de las orquídeas es polinizada únicamente por abejas sin aguijón del género *Trigona* y *Melipona* (Bağ et al., 2019).

A parte de su importancia ecológica, las abejas sin aguijón tienen importancia económica y cultural para distintas comunidades rurales donde se crían (*Meliponicultura*) y manejan por sus productos derivados (Esa et al., 2022). En Ecuador, la meliponicultura es bien reconocida y practicada en provincias como Loja, El Oro y Zamora Chinchipe (Erazo et al., 2023).

Además, las abejas sin aguijón son utilizadas como bioindicadores ambientales y ecológicos ya que se ven afectadas por cambios en el entorno natural, como son: la deforestación (Brown & Albrecht, 2001), el cambio climático (Robinson & Baudier, 2024), la introducción de especies exóticas (Trindade et al., 2023) y el cambio del uso del suelo (García et al., 2015; Real et al., 2022).

Considerando lo anterior, es importante fortalecer el cuidado de especies de abejas sin aguijón pues son fundamentales para un adecuado y equilibrado funcionamiento de los ecosistemas.

Productos derivados de las abejas sin aguijón

Las abejas sin aguijón, al contrario de especies carnívoras como las avispas, se alimentan únicamente de néctar y polen de plantas (Vossler, 2019). El polen además se ser una importante fuente de proteínas contiene, enzimas, vitaminas y minerales. Mientras que, el néctar es la principal fuente de carbohidratos (Da Silva et al., 2024).

En la colonia, el polen y el néctar se almacenan por separado en recipientes de cerumen contruidos a partir de una mezcla de resina y cera (McFrederick et al., 2012). El polen almacenado se fermenta mediante un proceso en cual las abejas añaden néctar y secreciones ricas en enzimas, junto con microorganismos. Finalmente, el recipiente se sella y permite la obtención del producto conocido como samburá o pan de abeja (Da Silva et al., 2024) .

Por otro lado, el néctar de las flores se transporta en el buche melífero, un órgano especial dentro del abdomen que recibe secreciones enzimáticas que procesan la sustancia. A continuación, en el nido las abejas lo depositan en los recipientes para que madure y finalmente se transforme en miel (Chuttong et al., 2016; Da Silva et al., 2024).

Miel de abejas sin aguijón

La miel es una sustancia natural, dulce y viscosa producida por las abejas a partir del néctar de las especies vegetales de las que se alimentan (Bogdanov, 2016). Es una fuente de energía natural que se ingiere crudo y comprende una composición nutricional compleja que depende de las condiciones de almacenamiento, especie de abeja, fuente floral y región geográfica (Karabagias et al., 2018).

En relación a ello, la estrategia de producción de miel de *Apis mellifera* consiste en eliminar humedad del néctar mediante sus alas, con la adición de enzimas que hidrolizan los azúcares y conservan la miel hasta un nivel en el cual los microorganismos ya no puedan crecer (Seeley, 1986).

En cambio, las abejas sin aguijón deshidratan la miel hasta un nivel específico (Vit et al., 2018). Más adelante los microorganismos consumen parte de los azúcares y los transforman en alcohol mediante fermentación anaeróbica. Seguidamente, el alcohol se convierte en ácido acético por medio de la fermentación aeróbica (Menezes et al., 2013; Souza et al., 2021). Por lo tanto, este proceso característico de las abejas sin aguijón le confiere propiedades únicas a su miel.

La miel de abejas sin aguijón es reconocida por su sabor y aroma distintivos, así como, por su textura fluida y cristalización lenta (Bakar et al., 2017). Además, es caracterizada por sus propiedades para actuar en la cicatrización y humectación de heridas, como antioxidante, antibacteriano y agente antiinflamatorio (Esa et al., 2022).

Características fisicoquímicas de miel de abejas sin aguijón

Las características fisicoquímicas tales como, pH, acidez, color, contenido de agua, entre otras de la miel de abeja sin aguijón ya ha sido estudiada (Gadge et al., 2024; Nordin et al., 2018).

Contenido de agua

La miel de abejas sin aguijón posee un contenido de agua entre el 20% y 40%, es decir, mayor que la miel de *Apis mellifera* (Biluca et al., 2016). Este parámetro se debe a la naturaleza húmeda y tropical de su hábitat, así como a las especies vegetales ricas en agua de las cuales recolectan el néctar (Esa et al., 2022). Igualmente, el contenido de agua afecta la estabilidad de la miel e influye sobre el crecimiento microbiano (Gadge et al., 2024).

Azúcares reductores

Si bien la miel de abeja sin aguijón tiene un sabor dulce, comúnmente posee menor cantidad de azúcares reductores, fructosa y glucosa que la miel de *Apis mellifera* (Ávila et al., 2018). Por ejemplo, se ha descrito que cada 100 g de miel de abeja sin aguijón contiene entre 15,0 a 48, 4 g de fructosa, entre 12,2 a 40,0 g de glucosa y un valor <0,01 a 7,3 g de sacarosa (Gadge et al., 2024). La diferencia en la concentración de azúcar está relacionada con la presencia de maltosa, la variabilidad de las especies y el clima de recolección (Biluca et al., 2016).

pH y acidez

La miel de abeja sin aguijón presenta un pH más bajo entre 3,2 a 4,5 y acidez mayor en comparación a la miel de *Apis mellifera* (Kek et al., 2017). El valor ácido del pH evita la proliferación de microorganismo dañinos (Gadge et al., 2024). Mientras que, la acidez se debe al proceso de fermentación que da como resultado una mayor presencia de ácidos orgánicos, incluidos fosfatos, sulfatos o cloruros. También, su sabor ácido y pH se asocian a la fuente del néctar, especie y enzimas propias (Evahelda et al., 2021).

Conductividad eléctrica

Todas las características fisicoquímicas descritas para la miel de abejas sin aguijón influyen sobre la conductividad eléctrica. A mayor concentración de ácidos orgánicos, minerales y cenizas mayor conductividad (Da Silva et al., 2024; Gadge et al., 2024). En este sentido, no existe diferencia significativa frente a miel de *Apis mellifera*. La conductividad eléctrica oscila entre 0,30 a 0,67 mScm⁻¹ (Biluca et al., 2016).

Elementos Minerales

La miel contiene una variedad de elementos minerales, entre ellos: el potasio que comprende un valor de 10,55 a 448 mg por cada 100 g⁻¹, el mismo representa la mitad de los componentes minerales totales. Además, contiene una pequeña cantidad de calcio entre 1,12 a 35,5 g por cada 100 g⁻¹ y un contenido promedio de magnesio (0,410 y 17,3 mg por 100 g⁻¹) y sodio (0,730 y 30,4 mg 100 g⁻¹) (Biluca et al., 2016; Gadge et al., 2024). Los minerales son esenciales para diversas funciones fisiológicas entre las que se destaca, la función cardíaca, salud ósea, función muscular y nerviosa (Esa et al., 2022).

Según Nanda et al., (2003) el contenido mineral se ve influenciado por factores como el tipo de flor del que toman el néctar, el tipo de suelo donde se cultivan y el color de la miel.

Color

A manera científica el color de la miel de abejas sin aguijón se evalúa a través de la escala de Pfund, que establece su variación desde un tono blanco claro hasta varios tonos ámbar claro y oscuro (Ávila et al., 2018). Aquellos compuestos que contribuyen a dar el color característico en la miel son los antioxidantes (carotenoides, xantofilas), minerales, aminoácidos y sustancias fenólicas (flavonoides). Es importante mencionar que la miel de color más oscuro tiene más minerales y acidez que la miel de tonos claros (Machado et al., 2018).

Hidroximetilfurfural (HMF)

El hidroximetilfurfural es una molécula orgánica utilizada como medida para evaluar la frescura y envejecimiento de la miel (Crane, 1980). Es un producto intermedio ausente en la miel fresca que aumenta su concentración durante el procesamiento (Gadge et al., 2024). De acuerdo con la comisión del Codex Alimentarius, la miel de regiones tropicales o con características como las descritas no deben superar los 80 mg/kg (Codex Alimentarius, 2019). En consecuencia, la miel de abeja sin aguijón evidencia valores bajos, oscilando entre 12,65 y 15,0 mg/kg (Salis et al., 2021).

Compuestos fenólicos

La miel de abejas sin aguijón contiene compuestos antioxidantes significativos, tales como los compuestos fenólicos (Ávila et al., 2018). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios bien conocidos por su actividad antimicrobiana y efectos antiinflamatorios (Lin et al., 2016). En la miel, están presentes ácidos fenólicos (ácido cafeico y ácido gálico), flavonoides y taninos en una concentración que varía entre 7 a 66 mg (Da Silva et al., 2013).

Microbiota asociada a las abejas sin aguijón

Las abejas sin aguijón suelen tener especies de microorganismos como componentes de su microbiota central (Cerqueira et al., 2024). Estos microbios desempeñan un papel importante en la nutrición de las abejas y su protección contra microorganismos patógenos (Menezes et al., 2013).

Los microorganismos llegan a los nidos por transmisión entre abejas, además de ser transportados por el polen, el aire y las flores (Alves et al., 2024). Un caso representativo es el de las bacterias *Lactobacillaceae*, ácido láctico ambientales presentes en las flores, polen y miel (Lachance et al., 2010). Estas bacterias se transmiten de forma horizontal, ya que, el contagio se produce a través del entorno de polinización o el contacto con el material de la colonia (miel o pan de abeja) (Powell et al., 2014).

No obstante, el conocimiento sobre la diversidad de microbios y su papel en las colonias de abejas sin aguijón es limitado, puesto que, la mayoría de información solo menciona su presencia no su función. Además, solo se dispone de información de unas pocas especies de abejas sin aguijón (Menezes et al., 2013).

A pesar de las limitaciones y teniendo en cuenta que la microbiota de las abejas sin aguijón también se refleja en sus subproductos, se indican los actores microbianos involucrados en la maduración de la miel y su potencial para producir compuestos bioactivos (Alves et al., 2024).

Microorganismos presentes en la miel

Las mieles crudas contienen diversas comunidades microbianas y aunque la microbiota asociada a la miel de las abejas sin aguijón aún es poco estudiada (Xiong et al., 2023). Se ha descrito que, los microorganismos asociados incluyen hongos y bacterias (Menezes et al., 2013).

Se han identificado dos géneros de bacterias presentes en miel de abejas sin aguijón, las más comunes son del género *Bacillus*, que cumplen un papel importante al secretar enzimas necesarias para la fermentación del polen y para los procesos de fermentación anaeróbica y aeróbica que ocurren durante la producción de la miel (Cano et al., 1994). Adicionalmente, estas bacterias alteran la composición de los productos para evitar la proliferación de patógenos gracias a la secreción de antibióticos (Gilliam, 1979).

Otro género de bacterias reportado en miel de abejas sin aguijón es *Streptomyces*, conocido por generar antibióticos le otorga a la miel una alta actividad inhibitoria contra patógenos bacterianos (Promnuan et al., 2009). Además, los filos bacterianos también compartidos por las especies de abejas sin aguijón son Proteobacterias y Actinobacterias (Melia et al., 2024).

A parte del componente bacteriano, las levaduras también forman parte de la microbiota de la miel de abejas sin aguijón. Hasta el momento se han identificado diez géneros, siendo los más representativos *Candida* y *Starmerella* (Camargo & Pedro, 1992). Su función es similar al de las bacterias, ya que, secretan enzimas necesarias para la transformación del néctar y polen (Menezes et al., 2013).

Rol de los microorganismos en la miel

Se sabe que los géneros de bacterias presentes en la miel de abejas sin aguijón ayudan a prevenir el deterioro de la miel al suprimir el crecimiento de microbios patógenos (Xiong et al., 2023). La estrecha interacción entre el contenido de agua de la miel y la actividad microbiana subraya la importancia de mantener niveles óptimos de humedad para su conservación. Dada su sensibilidad, las desviaciones pueden mejorar o comprometer su vida útil y calidad (Gadge et al., 2024; Menezes et al., 2013).

Además, se ha determinado que la presencia de microbios en la miel es esencial para llevar a cabo los procesos de fermentación del néctar y polen (Souza et al., 2021). Así también, la actividad microbiana le confiere a la miel propiedades terapéuticas superiores a las de la miel de *Apis mellifera* (Esa et al., 2022).

Métodos para la identificación de microorganismos en miel

La capacidad de detectar rápidamente microorganismos en alimentos, como la miel de abejas es importante para la salud pública y la seguridad alimentaria (Foddai & Grant, 2020). Tradicionalmente, las pruebas basadas en cultivo se han considerado como el “gold standard” para el análisis microbiológico de la miel (Bhunja, 2014). El cultivo típico se sustenta en la capacidad de los microorganismos para crecer y multiplicarse en medios de laboratorio, formando colonias visibles.

El cultivo es la primera opción dentro de los laboratorios, ya que, es una técnica sensible, fácil de usar, económica y ofrece información cuantitativa o cualitativa sobre la cantidad y tipo de microorganismo presente en la muestra (Dudley, 2001).

No obstante, el análisis de bacterias, mohos y levaduras utilizando métodos de cultivo no es un proceso rápido, dado que, requiere una serie de pasos para la confirmación definitiva del microorganismo. Este proceso incluye pre enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en medios selectivos y finalmente pruebas confirmatorias bioquímicas o morfológicas (Bhunja, 2014). Además, el proceso de cultivo comprende entre 2 a 3 días para la obtención de un análisis preliminar y hasta una semana para la confirmación final de las especies aisladas (Zhao et al., 2017). Finalmente, la distribución no uniforme y heterogeneidad de la muestra también podría implicar un sesgo del resultado (Foddai & Grant, 2020; Xiong et al., 2023).

Por lo tanto, los métodos basados en cultivo son insuficientes para caracterizar la diversidad microbiana total en matrices complejas como la miel de abejas sin aguijón (Xiong et al., 2023). Por ello, se ha impulsado el análisis de la microbiota con herramientas moleculares basadas en ácidos nucleicos, métodos rápidos, sensibles y específicos (Foddai & Grant, 2020).

Extracción de ADN

El ADN ambiental (eADN), definido como ADN extraído de especímenes o matrices relacionadas con el ambiente se ha catalogado como una herramienta poderosa para detectar y monitorear organismos crípticos, elusivos o invasivos (Ribani et al., 2020). En este sentido, la miel constituye una fuente de eADN fácilmente accesible, muy útil para la detección de patógenos y comprensión de la microbiota asociada (Lee et al., 2015).

Para el análisis de ADN en la miel, se requiere un método eficiente de extracción capaz de proporcionar extractos de ADN de alta cantidad y calidad (Soares et al., 2017). El método

elegido debe permitir la detección de mínimas cantidades de ADN de bacterias u hongos y evitar los inhibidores de PCR como cera, pigmentos, enzimas o partículas sólidas (Guertler et al., 2014).

Hasta el momento, se han informado métodos de extracción in-house o el uso de kits comerciales para la extracción de ADN a partir de miel. Guertler et al., (2014) utilizó métodos de extracción basados en tampón CTAB, el instrumento Maxwell 16 y el sistema de extracción de ácidos nucleicos Maxwell 16 FFS, Custom-Kit. Por otro lado, la aplicación de DNeasy Blood and Tissue Kit de Qiagen se informó en la extracción de ADN de miel en el ensayo realizado por Laube et al., (2010).

De este modo, Soares et al., (2017) evaluó diferentes tratamientos de preparación y extracción de ADN de muestras de miel, considerando cantidad, pureza e idoneidad para la amplificación. El ensayo evidenció que los métodos CTAB y DNeasy kits resultaron eficaces para extracción y amplificación molecular.

Específicamente, el método de extracción manual con tampón CTAB se basa en el uso de un detergente catiónico capaz de romper la pared celular y por tanto producir la lisis de las células de una muestra compleja como la miel (Jain et al., 2013). El CTAB, en presencia de EDTA (agente quelante) y TRIS HCl (tampón), forma complejos poco solubles con el ADN. El paso posterior es la extracción de los residuos orgánicos con cloroformo, seguida de la separación del ADN mediante precipitación con etanol (Schenk et al., 2023).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Actualmente, la vigilancia de la miel y sus productos derivados es realizado mediante análisis de ADN (Guertler et al., 2014). En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa es un método molecular desarrollado en 1986 por Mullis et al, que permite obtener millones de

copias de toda o una parte de una secuencia de ADN específica de un organismo para un análisis más detallado.

Dado que la PCR solo puede detectar una secuencia de ADN específica por vez y a menudo hay gran diversidad de microorganismos en una muestra compleja, como la miel, se han desarrollado variaciones del método (Zhang et al., 2022). A continuación, se describen las variantes más utilizadas para la detección y compresión de microbiota en muestras de alimentos.

PCR multiplex

La reacción en cadena de la polimerasa multiplex utiliza la combinación de múltiples conjuntos de cebadores en una única mezcla de PCR para producir amplicones de diferentes tamaños que permiten la identificación precisa de diferencias secuencias de ADN. El conjunto de cebadores está diseñado para optimizar sus temperaturas de hibridación y funcionar correctamente en una sola reacción (Bluth & Bluth, 2018).

qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es una técnica que detecta y cuantifica la expresión génica en tiempo real a través de la amplificación de secuencias de ADN específicas y midiendo la fluorescencia emitida por los amplicones de la PCR. La intensidad de la fluorescencia emitida se correlaciona con la concentración del ADN objetivo en la muestra (Avery et al., 2013).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que detectan polimorfismos, es decir, permiten identificar diferencias entre individuos o especies basándose en los cambios presentes en su secuencia de nucleótidos. Estas variaciones pueden ser inserciones, deleciones de nucleótidos, errores de replicación o duplicaciones (Özbek, 2024).

En muestras de miel el análisis de secuencias de productos de PCR obtenidos se lleva a cabo utilizando cebadores “universales” de bacterias y hongos dirigidos a los genes de ARN ribosómico, 16S rRNA e ITS respectivamente. El uso de este tipo de marcadores permite la identificación y caracterización de su diversidad en la miel (Olivieri et al., 2012).

Gen 16S rRNA

Los genes de ARN ribosómico han sido utilizados como marcadores filogenéticos estándar en estudios taxonómicos moleculares desde los estudios pioneros de Woese & Fox en 1977. Su amplia gama de regiones variables, naturaleza conservada y distribución ubicua en todos los linajes de bacterias y arqueas ayudaron al uso de genes de ARN ribosomal para diversos fines taxonómicos (Kim & Chun, 2014).

El uso de las secuencias del gen de ARNr 16S para la clasificación e identificación de procariotas depende generalmente de comparaciones con bases de datos de secuencias conocidas (Chun & Rainey, 2014). No obstante, debido a la tasa de evolución relativamente lenta, la secuencia del gen presenta alta similitud con especies relacionadas, lo que dificulta una diferenciación precisa. Ante este problema, se subraya la necesidad de bases de datos más depuradas o el uso de un diferente marcador molecular (Kim & Chun, 2014).

Región espaciadora transcrita interna (ITS)

La región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal, ha sido objetivo fundamental en la sistemática fúngica, dado que, se utiliza como marcador de código de barras de ADN (Kauserud, 2023). Su naturaleza variable con amplia información, su fácil amplificación y sus regiones conservadas necesarias para el diseño de cebadores los hacen útiles para estudios filogenéticos en hongos (Gardes & Bruns, 1993).

El espaciador transcrito interno al tener una tasa de evolución más rápida, es más adecuado para el análisis a nivel de especie, ya que, el alineamiento sobre nivel de género o

familia es complicado debido a su alta variabilidad (Gardes & Bruns, 1993). Así mismo, el principio de identificación se basa en la comparación con bases de datos que acumulan un gran número de secuencias ITS correspondientes a distintas especies (Schoch et al., 2012).

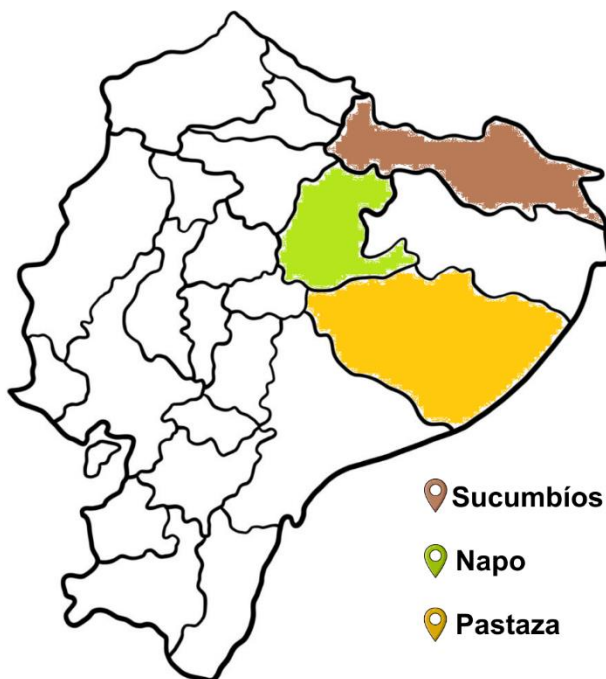
CAPÍTULO III: Materiales y Métodos

Procedencia de las muestras

La presente investigación forma parte del proyecto titulado “*Meliponiculture: a sustainable tool in agro-ecological systems for rural communities in Ecuador*”. Las muestras de miel utilizadas en el estudio fueron recolectadas en distintas provincias de la Región Amazónica del Ecuador (*Figura 2*). El muestreo se llevó a cabo en los meses de septiembre - octubre de 2024 y febrero - agosto de 2025 en nidos pertenecientes a especies de abejas sin aguijón.

Figura 2

Procedencia geográfica de muestras de miel de abejas sin aguijón



Se recolectó un total de 51 muestras de miel en nidos de especies de abejas sin aguijón. El código del nido y la especie de procedencia se detallan en la *Tabla 1*.

Tabla 1*Identificación de las muestras de miel en nidos de abejas sin aguijón*

Provincia	Código de Nido (Investigación)	Código de Nido (Sector)	Especie
Napo	SCY3	TSAB01.1	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	SCY5	TSAA001.1	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	SCY6	TSAB01	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	SCY8	TSAM01	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	SCF7	TSIA7	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	SCF8	TSIA8	<i>Scaptotrigona</i> sp.
	TAY1	TTAA9	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAY2	TTAY10	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAY3	TTAY11	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAY5	TTYM001	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAY6	TTYM003	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAY7	TAAY07	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAVM1	TAV001	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAU1	TAU1	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAU2	TAU2	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAU5	TAU5	<i>Tetragonisca</i> sp.
	TAU7	TAU7	<i>Tetragonisca</i> sp.
	MPY1	AGRE003	<i>Melipona grandis</i>
	MPY2	TGAY01	<i>Melipona grandis</i>
	MPY3	TERM02	<i>Melipona eburnea</i>
	MPY4	TERM01	<i>Melipona eburnea</i>
	MPY5	TEYM01	<i>Melipona eburnea</i>

Provincia	Código de Nido (Investigación)	Código de Nido (Sector)	Especie
	MPY6	TEJY01	<i>Melipona eburnea</i>
	MPY7	TEJY02	<i>Melipona eburnea</i>
	MPF8	FIIA002	<i>Melipona illota</i>
	MPH1	PCCH001	<i>Melipona</i> sp.
	MPH7	AEMM003	<i>Melipona eburnea</i>
Sucumbíos	MPE1	TEMA002	<i>Melipona eburnea</i>
	MPE3	AEMU001	<i>Melipona eburnea</i>
	MPVM1	PSVC001	<i>Melipona eburnea</i>
Pastaza	MEC2	N2 ME2	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC3	ME3	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC5	ME5	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC6	ME6	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC7	ME7	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC8	ME8	<i>Melipona eburnea</i>
	MEC9	ME9	<i>Melipona eburnea</i>
	MIC1	MI md	<i>Melipona illota</i>
	MIC2	MI hija	<i>Melipona illota</i>
	MG1	MG md	<i>Melipona grandis</i>
	MG2	MG hija	<i>Melipona grandis</i>
	MG3	MG og	<i>Melipona grandis</i>
	PT1	Ptilotrigona	<i>Ptilotrigona</i> sp.
	TAS1	16OT	<i>Tetragonisca angustula</i>
	TAS2	21OT	<i>Tetragonisca angustula</i>
	TES1	18OT	<i>Tetragona</i> sp.

Provincia	Código de Nido (Investigación)	Código de Nido (Sector)	Especie
	TED1	ST01	<i>Tetragona</i> sp.
	TAC1	TC01	<i>Tetragonisca angustula</i>
	NAC1	NC01	<i>Nannotrigona</i> sp.
	MPC1	MC01	<i>Melipona</i> sp.
	NCRY1	NCRY	<i>Nannotrigona</i> sp.

Nota. Código de nido (Investigación): Asignación única de cada muestra para su uso durante todo el análisis y procesamiento de datos. Código de Nido (Sector): Asignación para la identificación de nidos en el lugar de colecta.

Posteriormente, las muestras fueron trasladadas y almacenadas a 4°C hasta su análisis en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Estandarización de un protocolo de extracción

Procesamiento de las muestras

Previo a la extracción de ADN, se adoptó el procesamiento de la muestra según lo descrito por Ribani et al., (2020) y Utzeri et al., (2018). Para ello, cada muestra de miel fue diluida en un tubo falcón estéril de 15 mL. Se colocó 2 mL de miel por cada 6 mL de agua ultrapura y se agitó en vórtex hasta la disolución completa. Los 8 mL resultantes de la dilución se dividieron en cuatro tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugaron a 16°C durante 10 minutos a 14 000 RCF o 13 550 RPM, se descartó el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en 250 µL de agua ultrapura y el contenido de los cuatro tubos se combinó en uno solo (*volumen final: 1 mL*). Se realizó una segunda centrifugación a 16°C durante 10 minutos a 14 000 RCF o 13 550 RPM, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 µL de agua ultrapura y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL que contenía 4 perlas de vidrio.

La suspensión se agitó en vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, se retiraron las perlas y el líquido se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL (*Nota. Si la extracción de ADN no es inmediata, la muestra puede ser almacenada a -20°C*).

Nota. Con el objetivo de maximizar la concentración de biomasa se evaluó el incremento progresivo del volumen de muestra, distribuido en cuatro ciclos de centrifugación sucesivos.

Protocolo de extracción de ADN

El protocolo descrito por Ribani et al., (2020) y Utzeri et al., (2018) se adaptó para lograr la extracción de ADN a partir de miel con alta cantidad y pureza. Inicialmente, se siguió el procedimiento que se describe a continuación.

La extracción se realizó añadiendo 1 mL de buffer de extracción CTAB [2 % (p/v) de bromuro de cetiltrimetilamonio; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; pH 8], 5 µL de RNAsa A (10 mg/mL) y 30 µL de proteínasa K (20 mg/mL) a los tubos con la suspensión preparada. Los tubos se incubaron a 65°C durante 90 minutos con agitación suave (200 RPM), se enfriaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 10 minutos a 16 000 RCF a 16 °C. A continuación, se transfirieron 700 µL del sobrenadante a otro tubo que contenía 500 µL de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex durante 30 segundos y seguidamente se centrifugo a 16 000 RCF por 15 minutos a 16°C. El sobrenadante resultante se colocó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. El ADN se precipitó con 500 µL de isopropanol y se lavó con 500 µL de etanol al 70%. Se realizaron centrifugaciones a 16 000 RCF por 10 y 5 minutos a 16°C respectivamente, en cada paso se descartó el sobrenadante. Finalmente, el tubo se dejó secar frente al mechero por 10 minutos y el ADN se rehidrató con 30 µL de agua ultrapura durante toda la noche.

Posterior a la evaluación inicial, se introdujeron modificaciones en (n = 3) variables con el objetivo de mejorar significativamente el rendimiento y calidad del ADN extraído. Las variantes exploradas se describen en la *Tabla 2*.

Tabla 2

Variaciones exploradas en base al protocolo de Ribani et al., (2020) y Utzeri et al., (2018)

Paso	Protocolo inicial	Variación
RNAsa A	5 µL	10 µL
		20 µL
		30 µL
Tiempo de incubación en la lisis	90 minutos	60 minutos
		30 minutos

Variación 1

Paso 1: 1 mL de buffer CTAB y 30 µL de RNAsa A, incubación 37°C por 15 min.

Paso 2: 30 µL de PK, incubación 65°C, 200 RPM, 30 min.

Variación 2

Paso 1: 1 mL de buffer CTAB y 30 µL de RNAsa A, incubación 37°C por 15 min.

Paso 2: 30 µL de PK, incubación 65°C, 200 RPM por 30 min.

Orden de adición de enzimas en la lisis

Paso 1: Adición de 1 mL de buffer de extracción CTAB, 5 µL de RNAsa A y 30 µL de Proteinasa K, incubación 65°C por 30 min

Paso	Protocolo inicial	Variación
		Paso 3: Desactivación de PK, incubación a 95°C por 10 min. Variación 3 Paso 1: 1 mL de buffer CTAB y 30 uL de PK, incubación 65°C, 200 RPM por 30 min. Paso 2: Extracción Cloroformo: Alcohol Isoamílico. Paso 3: 30 uL de RNAsa A, incubación 37°C, por 15 min. Variación 4 Paso 1: 1 mL de buffer CTAB y 30 uL de PK, incubación 65°C, 200 RPM por 15 min. Paso 2: Desactivación de PK, incubación a 95°C por 10 min. Paso 3: Muestra a T° ambiente, 30 uL de RNAsa A, incubación 37°C, por 15 min.

Cuantificación del ADN

Se cuantificó la concentración de ADN en µg/mL. Así mismo, se evaluaron índices de pureza A260/230 y A260/280. La lectura espectrofotométrica se realizó utilizando 2 µL de la muestra en la placa µDrop Duo™, equipo Multiskan SkyHigh Thermo Scientific™.

Integridad del ADN

La integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa se preparó a una concentración del 0.8% utilizando 1 µL de Sybr safe (*agente de tinción para la visualización de ácido nucleicos*) por cada 30 mL. Se cargaron 6 µL de cada muestra (*preparadas en una proporción 5:1 con buffer de carga*) y 1 µL de marcador de peso molecular 1 kb. La migración electroforética en buffer TBE 1X se ejecutó a 110 V durante 65 minutos. Finalmente, el gel se visualizó en el sistema de imágenes ChemiDoc Bio-Rad.

Análisis Molecular

PCR 16S RNA para bacterias

La identificación de ADN bacteriano se evaluó mediante la ejecución de una PCR de punto final dirigida a la amplificación del gen 16s RNA utilizando los primers 27F y 1492R descritos por Weisburg et al, en 1991 . En este sentido, la *Tabla 3* lista las secuencias de los primers empleados.

Tabla 3

Secuencia primers 27F y 1472R

Primer	Sentido	Secuencia 5' – 3'	Tamaño
27F	Forward	AGATTTGATYMTGGCTCAG	1 465 – 1 500 pb
1492R	Reverse	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	

Por otro lado, la *Tabla 4* presenta la composición de la mezcla de reacción para un volumen final de 25 µL.

Tabla 4*Volumen de reactivos para la mezcla de reacción*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H ₂ O	μL	-	-	18.15
Buffer + Mg ⁺²	X	10.00	1.00	2.50
27F	μM	10.00	0.35	0.88
1942R	μM	10.00	0.35	0.88
Cl ₂ Mg	mM	50.00	2	0.00
dNTP	mM	10.00	0.8	0.50
Taq	U/μL	5.00	0.5	0.10
ADN	Ngr	25.00	50.00	2.00
Volumen Final				25

Finalmente, la *Tabla 5* resume las condiciones de amplificación utilizadas en el termociclador ProFlex™ 3x32-well PCR system.

Tabla 5*Condiciones de amplificación*

Etapas	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización			
Inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	54	30 s	35
Extensión	72	1.45 min	
Extensión Final	72	10 min	1

La visualización de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa se preparó a una concentración del 1% utilizando 1 µL de Sybr safe por cada 10 mL. Se cargaron 5 µL de cada muestra (*preparadas en una proporción 4:1 con buffer de carga*) y 1 µL de marcador de peso molecular 1 kb. La migración electroforética en buffer TBE 1X se ejecutó a 110 V durante 60 minutos. Finalmente, el gel se visualizó en el Foto documentador.

PCR ITS para hongos

La identificación de ADN fúngico se evaluó mediante la ejecución de una PCR de punto final dirigida a la amplificación de las regiones ITS utilizando los primers ITS1F e ITS4 descritos por Gardes & Bruns (1993) y White et al (1990), respectivamente. La *Tabla 6* contiene las secuencias de los primers empleados.

Tabla 6

Secuencia primers ITS1F e ITS4

Primer	Sentido	Secuencia 5' – 3'	Tamaño
ITS1F	Forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	300 – 800 pb
ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

A continuación, la *Tabla 7* describe los reactivos parte de la mezcla de reacción para un volumen total de 25 µL.

Tabla 7

Volumen de reactivos para la mezcla de reacción

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (µL)
H ₂ O	µL	-	-	17.40
Buffer + Mg ⁺²	X	10.00	1.00	2.50

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
ITS1F	μM	10.00	0.50	1.25
ITS4R	μM	10.00	0.50	1.25
Cl ₂ Mg	mM	50.00	2	0.00
dNTP	mM	10.00	0.8	0.50
Taq	U/μL	5.00	0.5	0.10
ADN	Ngr	25.00	50.00	2.00
Volumen Final				25

Así mismo, la *Tabla 8* resume las condiciones de amplificación utilizadas en el termociclador ProFlex™ 3x32-well PCR system.

Tabla 8

Condiciones de amplificación

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización			
Inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	55	30 s	35
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	10 min	1

La visualización de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa se preparó a una concentración del 1.5% utilizando 1 μL de Sybr safe por cada 10 mL. Se cargaron 5 μL de cada muestra (*preparadas en una proporción 4:1 con buffer de carga*) y 1 μL de marcador de peso molecular 100 pb. La migración electroforética

en buffer TBE 1X se ejecutó a 100 V durante 30 minutos. Finalmente, el gel se visualizó en el Foto documentador.

Evaluación de la extracción de ADN de bacterias Gram positivas y Hongos mediante el protocolo de extracción optimizado

Considerando la existencia de un posible sesgo en la recuperación de ADN microbiano y fúngico. Se realizó la extracción de ADN aplicando el protocolo optimizado en cultivos puros de una bacteria gram positiva (*Bacillus cereus*) y un hongo filamentoso. El ADN extraído fue utilizado como molde en reacciones de PCR dirigidas a la amplificación del gen 16S rRNA y la región ITS, respectivamente. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Análisis estadístico

Los datos de concentración y pureza del ADN extraído fueron analizados estadísticamente con el objetivo de comparar la eficiencia de las modificaciones en el protocolo inicial. Además, para identificar si el protocolo optimizado exhibe diferencias en el rendimiento de distintos grupos funcionales de miel y evaluar si los índices de pureza 260/230 e 260/280 se encuentran dentro de los rangos establecidos como óptimos 2.00 – 2.20 y 1.80 – 2.00, respectivamente.

Debido al limitado número de muestras de miel por género, las muestras se agruparon considerando características biológicas y ecológicas entre los géneros de abejas sin aguijón. Los grupos establecidos fueron: 1) *Melipona* sp; 2) Trigonas robustas (*Scaptotrigona* sp, *Tetragona* sp y *Ptilotrigona* sp); 3) Trigonas pequeñas (*Tetragonisca* sp y *Nannotrigona* sp).

Adicionalmente, la determinación de la presencia o ausencia de ADN bacteriano y fúngico en las muestras permitió el cálculo de la prevalencia global y para cada grupo de miel de abejas sin aguijón. El nivel de significancia para todas las pruebas estadísticas se estableció

en $\alpha = 0,05$. Los datos se organizaron y analizaron con ayuda de los softwares GraphPad Prism, Infostat y Excel.

A continuación, la *Tabla 9* describe las pruebas estadísticas empleadas para el análisis de datos.

Tabla 9

Pruebas estadísticas para el análisis de datos

Prueba estadística	Definición	Variable
Coeficiente de correlación de Spearman (ρ)	Medida no paramétrica que evalúa la relación entre dos variables.	Correlación entre los Ciclos de Centrifugación y Concentración de ADN.
Shapiro – Wilks (W)	Evalúa la normalidad de un conjunto de datos.	Concentración de ADN e índices de pureza 260/230 y 260/280.
Levene (F)	Evalúa la homogeneidad de varianzas entre grupos (homocedasticidad).	Concentración de ADN e índices de pureza 260/230 y 260/280.
ANOVA de una vía (F)	Prueba paramétrica que compara la media de grupos para determinar si existen diferencias significativas.	Índice de pureza 260/280 - optimización de volumen de RNAsa A.
ANOVA Welch (F)	Prueba paramétrica que compara la media de grupos para determinar si existen diferencias significativas, cuando no se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas.	Concentración de ADN e índice de pureza 260/230 - optimización de volumen de RNAsa A.
Kruskal Wallis (H)	Prueba no paramétrica que compara las medianas de grupos	Concentración de ADN - análisis protocolo optimizado.

Prueba estadística	Definición	Variable
	para determinar si existen diferencias significativas.	
Chi cuadrado (χ^2)	Determina si la prevalencia de una condición es igual en diferentes grupos o si hay independencia entre las variables.	Evaluar la diferencia entre las prevalencias de los grupos de miel de abeja sin aguijón.

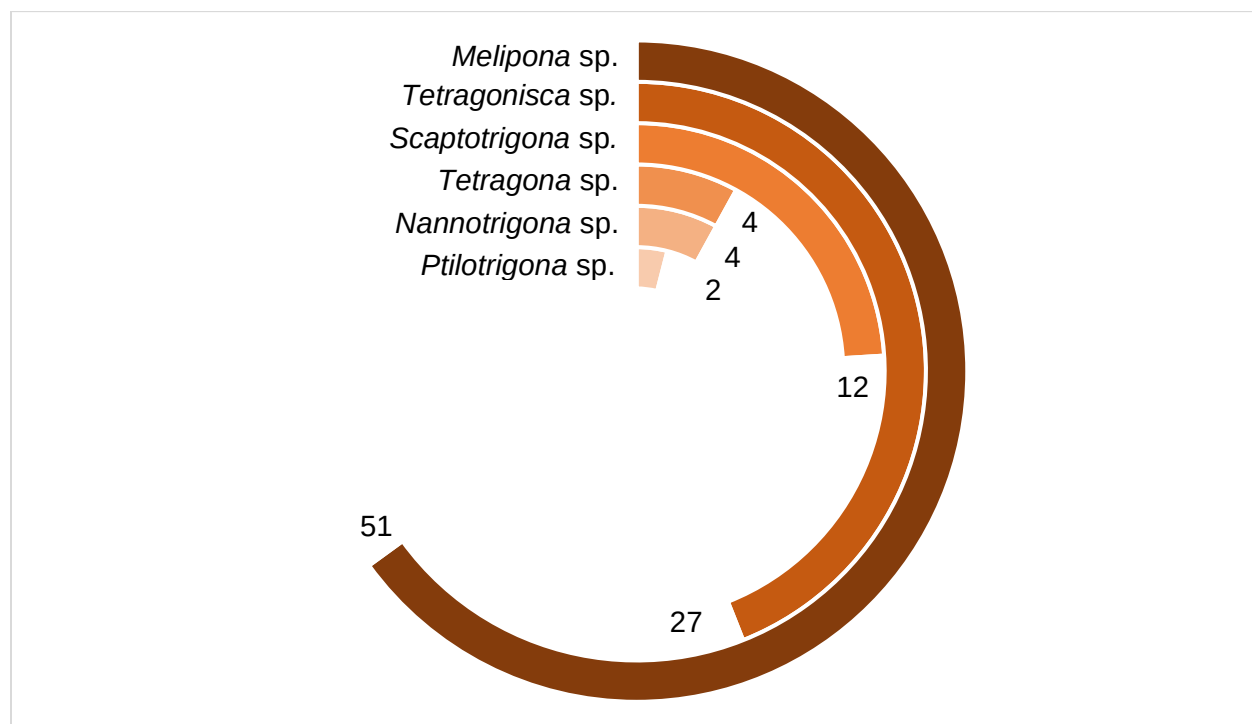
CAPÍTULO IV: Resultados

Categorización de muestras según el género

Las 51 muestras de miel recolectadas en nidos de abejas sin aguijón se clasificaron de acuerdo al género de procedencia. En este sentido, se destacan las mieles del género *Melipona* sp. que representan el 51% de las muestras totales recolectadas para el análisis (Figura 3). La mayoría de estudios se centran en su mayoría en los géneros *Melipona* sp., *Scaptotrigona* sp., y *Tetragonisca* sp (Engel et al., 2016; Hrcir et al., 2016; Ramalho et al., 1990). Sin embargo, este trabajo se presenta como uno de los primeros estudios en integrar géneros menos documentados como *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp., y *Nannotrigona* sp. lo que aportara un mayor conocimiento sobre el microbioma en miel de abejas sin aguijón.

Figura 3

Clasificación porcentual de muestras de miel de abejas sin aguijón según el género.



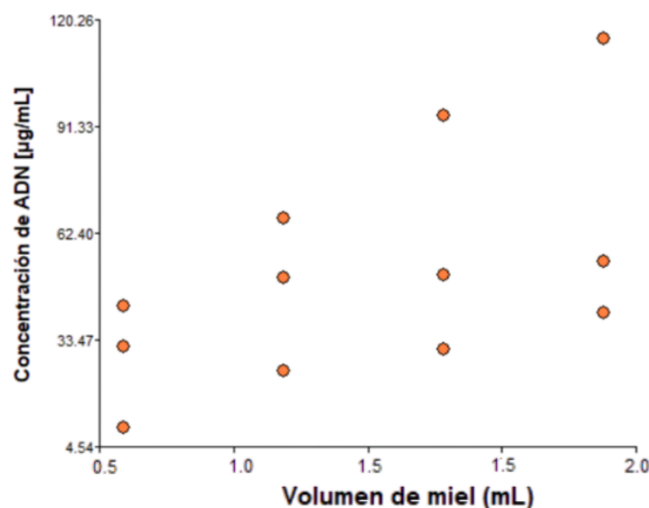
Estandarización del protocolo de extracción de ADN

Concentración de biomasa

Durante el procesamiento inicial de la muestra se buscó maximizar la recuperación del material celular presente en la miel. Por ello, se evaluaron ciclos de centrifugación. Al comparar la concentración final de ADN, se observa que tras un ciclo de centrifugación se extrae $\bar{x} = 22.15 \pm 17.96 \mu\text{g/ mL}$. La concentración media más alta se registró tras cuatro ciclos de centrifugación, alcanzando $\bar{x} = 64.05 \pm 34.44 \mu\text{g/ mL}$. Conforme se aumentan los ciclos, se evidencia un incremento progresivo del rendimiento, sin embargo, no fue estadísticamente significativo ($p = 0.5182$, $p = 0.0936$) (*Figura 4*). La falta de significancia pudo deberse posiblemente al reducido número de muestras de prueba ($n = 12$). No obstante, hay otros estudios (Junicke et al., 2014; Martellini et al., 2005) que han empleado métodos de centrifugación/precipitación para la concentración de biomasa a partir de muestras ambientales y han demostrado que los procedimientos de múltiples pasos de centrifugación produce la mejor recuperación celular, alcanzando eficiencias superiores al 97%. Por el contrario, la baja eficiencia de centrifugación provoca pérdida celular y a su vez una limitación en la cantidad total de ADN disponible para aplicaciones moleculares posteriores (Martellini et al., 2005).

Figura 4

Correlación ciclos de centrifugación – concentración de ADN

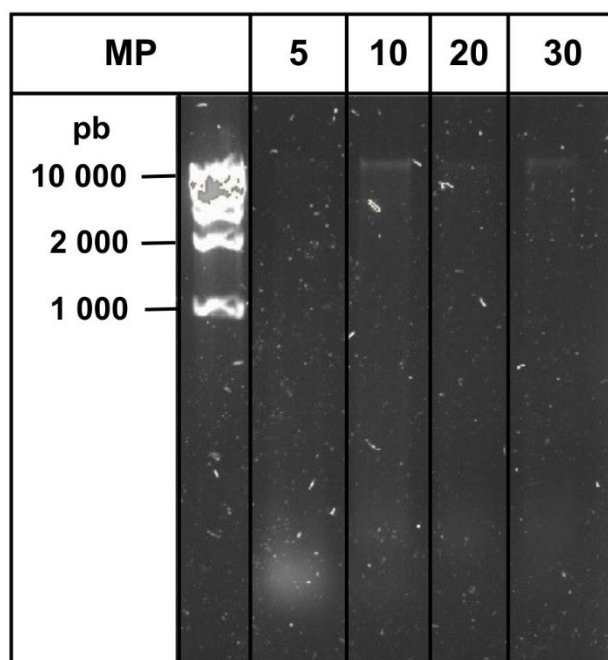


Optimización volumen de RNasa A

Tras la evaluación de distintos volúmenes de la enzima RNasa A (10 µL, 20 µL, 30 µL) en el protocolo de extracción se realizó una visualización cualitativa del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos permitieron establecer que 30 µL es el volumen más adecuado para maximizar el rendimiento del protocolo de extracción (*Figura 5*). En general, no existe un volumen máximo universal de RNasa A. Por un lado, un volumen bajo de la enzima podría resultar en una digestión incompleta del ARN en la muestra, y por tanto, generar una sobreestimación del rendimiento del ADN cuando la cuantificación se realiza mediante espectrofotometría a 260 nm (Freifelder, 1978). Por otro lado, la adición de un volumen excesivo de la enzima resultaría en la reducción del índice 260/280, es decir, una sobreestimación en la contaminación proteica de la muestra (Sanchez et al., 2015).

Figura 5

Evaluación cualitativa del volumen RNasa A

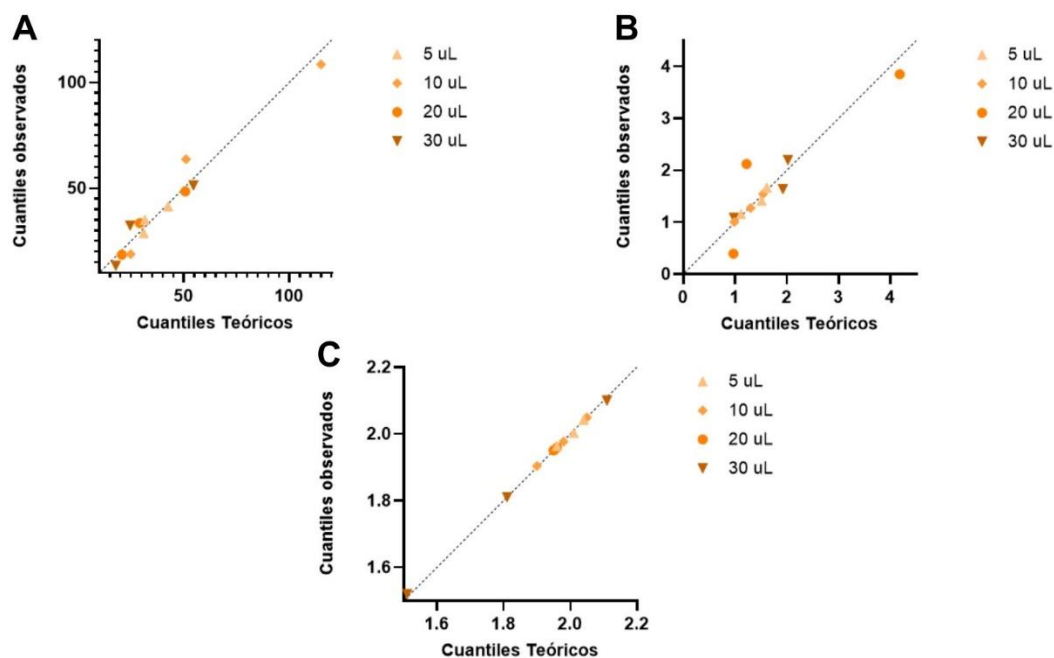


Según Fu et al., (2021) es importante que los protocolos de extracción de ADN incluyan un paso de digestión con la enzima RNasa A para permitir una cuantificación precisa del ADN total. En este sentido, la optimización del volumen de RNasa A resulta imperativa en la obtención de ADN con buen rendimiento y calidad en nuestro estudio.

Los efectos de la RNasa A sobre las variables; concentración del ADN e índices de pureza 260/230 y 260/280 siguen una distribución normal ($W = 0.75$, $p = 0.3333$; $W = 0.33$, 0.1319 y $W = 0.79$, $p = 0.7562$) respectivamente (*Figura 6*). No obstante, el supuesto de homocedasticidad únicamente lo cumple el índice de pureza 260/280 ($F = 2.90$, $p = 0.1019$). Además, no existen diferencias significativas entre volúmenes de RNasa A para ninguna de las variables: concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$) ($F = 0.97$, $p = 0.4544$), índice 260/280 ($F = 1.00$, $p = 0.4418$) e índice 260/230 ($F = 0.92$, $p = 0.4740$) (*Tabla 10*). Así mismo, la media del indicador de pureza de las muestras de ADN ($A_{260/280}$) se mantuvo en el rango ideal para todos los volúmenes de RNasa A.

Figura 6

Supuestos de normalidad para las variables según el 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

Tabla 10

Valores promedio y desviación estándar de las tres variables según el volumen de la enzima RNasa A

Volumen RNasa A	Concentración de ADN [μg/mL]	A260/230	A260/280
5 μL	$\bar{x} = 35.07 \pm 6.53$	$\bar{x} = 1.41 \pm 0.26$	$\bar{x} = 2.00 \pm 0.04$
10 μL	$\bar{x} = 63.67 \pm 46.35$	$\bar{x} = 1.27 \pm 0.28$	$\bar{x} = 1.98 \pm 0.08$
20 μL	$\bar{x} = 33.53 \pm 15.46$	$\bar{x} = 2.12 \pm 1.79$	$\bar{x} = 1.95 \pm 0.01$
30 μL	$\bar{x} = 32.33 \pm 19.58$	$\bar{x} = 117 \pm 200.05$	$\bar{x} = 1.81 \pm 0.01$
<i>P – valor</i>	0.4544	0.4740	0.4418

Nota. Valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Tras la evaluación espectrofotométrica, se podría concluir que el volumen de RNasa A no afecta la calidad ni el rendimiento del ADN obtenido. No obstante, dado que los métodos de cuantificación espectrofotométricos tienen incertidumbres analíticas inherentes al no discernir entre ácidos nucleicos, el análisis de integridad del ADN reveló que a volúmenes bajos (5 – 10 – 20 μL) de RNasa A se observa bandas difusas en la parte inferior del gel sinónimo de digestión incompleta de ARN. Por el contrario, el carril correspondiente a 30 μL mostró una banda de ADN de alto peso molecular más nítida y por ello se estableció como óptimo para el protocolo de extracción de miel de abejas sin aguijón.

Optimización tiempo de incubación

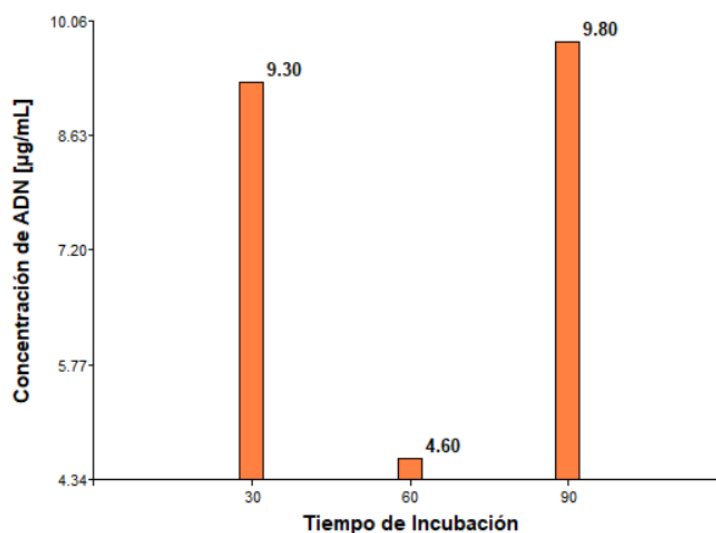
De acuerdo con Awaliyah & Prayekti, (2024) el tiempo de incubación es uno de los factores que más influye en la calidad del ADN. En este sentido, el ADN puede dañarse si el tiempo de incubación es muy largo; mientras que, un tiempo muy corto no permite la degradación de los orgánulos y salida del ADN. Finalmente, un tiempo de incubación adecuado

conseguiría maximizar la degradación de proteínas en las paredes celulares y la liberación del ADN de las células (Maftuchah et al., 2015).

Posterior a la evaluación de los tiempos de incubación con el buffer de lisis CTAB, se determinó que el tiempo óptimo es de 30 minutos. Este período fue seleccionado, dado que, permitió obtener concentraciones de ADN ($\mu\text{g/mL}$) similares a las del protocolo inicial y minimizó la degradación de la muestra (*Figura 7*). En este contexto, Awaliyah & Prayekti, (2024) determinaron que el tiempo de incubación idóneo para extraer ADN de calidad a partir de células procariotas, cuya estructura celular es simplificada es de 10 minutos. Sin embargo, Handayani et al., (2021) demostraron que extraer ADN de células más complejas requiere períodos de incubación prolongados, siendo los 30 minutos el tiempo que exhibe mayor concentración de ADN.

Figura 7

Evaluación tiempos de incubación



Dado que, la mezcla de ADN de miel se origina de diversos organismos como hongos, bacterias, virus y plantas (Paluoja et al., 2025), se requiere un método de extracción robusto.

Por ello, el tiempo de incubación de 30 minutos resultó eficaz para la liberación de ADN de todos sus organismos componentes, tanto procariotas (bacterias) como eucariotas (hongos).

Evaluación de la integridad del ADN: Validación de modificaciones en la lisis

De acuerdo con Davis et al., (1986) un protocolo de extracción de ácidos nucleicos incluye el uso de la Proteinasa K para liberar el ADN de las células, seguido de un paso con RNasa A para la eliminación del RNA. Para que ambas enzimas ejerzan su función de manera eficiente el orden de adición y condiciones de incubación deben controlarse estrictamente (Fu et al., 2021).

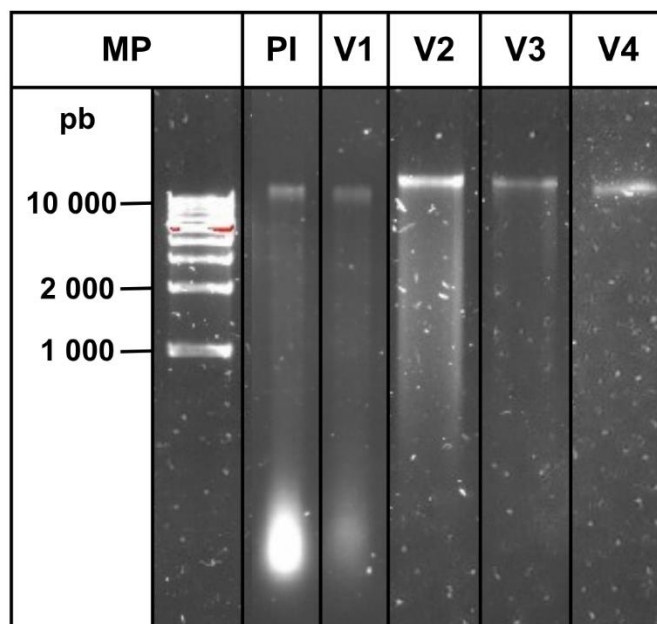
Tanto la Proteinasa K como la RNasa A muestran actividad en un amplio rango de temperatura (20 – 60 °C) (Bergmeyer et al., 1965). Sin embargo, Sambrook & Russell, (2001) recomendaron incubaciones a 37°C por 15 a 30 minutos para la RNasa A, mientras que, Farrell, (2017) describió que la Proteinasa K exhibe su mayor actividad a 65°C.

En este contexto, el análisis cualitativo de las variaciones implementadas en la fase lisis que se centraron en la secuencia de adición de las enzimas, determinó que, el protocolo inicial y las variaciones 1, 2 y 3 mostraron evidencias de degradación (*smear*) o baja recuperación (*Figura 8*).

Rauber et al., (1978) describieron que la Proteinasa K es efectiva para inactivar la acción de la RNasa A y este poder de degradación se potencia cuando la Proteinasa K se junta con la Tripsina. Por lo tanto, la eficiencia de la reacción disminuye al adicionar ambas enzimas simultáneamente o al añadir la RNasa A previo a la acción de la Proteinasa K. Esto se evidenció en las variaciones 1 y 2 que mostraron concentraciones de ADN con media de $22.43 \pm 19.65 \mu\text{g/mL}$ y de $20.30 \pm 22.12 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 8

Evaluación de la integridad del ADN: Variación en la lisis



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

Por otro lado, la variación 3 que incluyó la adición de RNAsa A tras la extracción orgánica, siguiendo lo propuesto por Healey et al., (2014) en protocolos con CTAB resultó ser la menos efectiva, dado que, presentó valores de concentración de ADN con media de $3.7 \pm 4.45 \mu\text{g/mL}$ y degradación.

En contraste, la variación 4 (*Figura 4*) que incorporó la acción inicial de la Proteinasa K produjo bandas de ADN de excelente integridad, sin algún tipo de degradación y una media de concentración de ADN alta de $20.53 \pm 5.95 \mu\text{g/mL}$. Las bandas de ADN integro, se localizaron en la parte superior del gel demostrando el alto peso molecular del ADN.

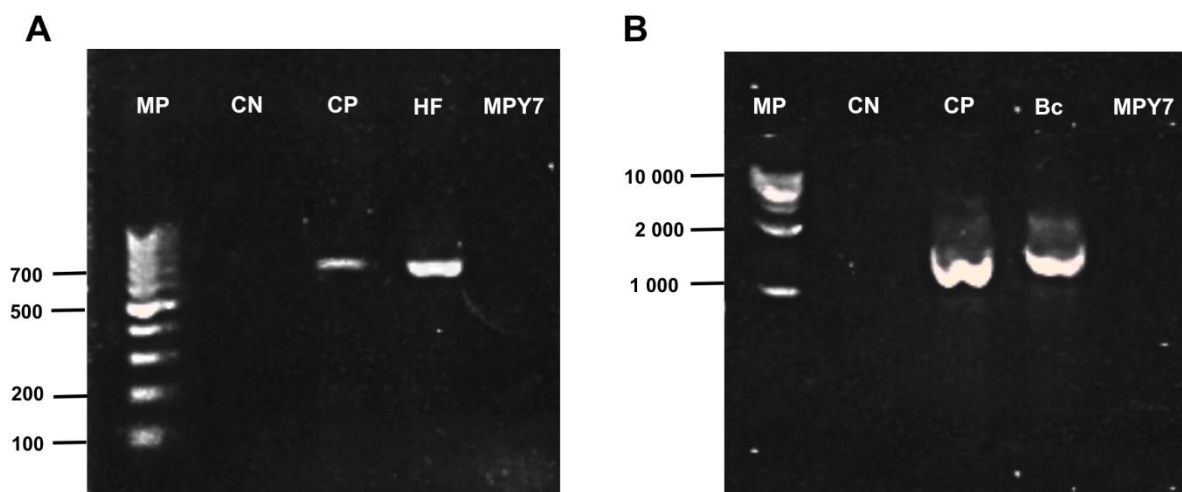
Validación del protocolo de extracción para bacterias Gram positivas y hongos

La aplicación del protocolo de extracción de ADN en cultivos puros de *Bacillus cereus* y el hongo filamentoso permitió validar la robustez del método empleado en este estudio,

asegurando la recuperación de ADN incluso en aquellos microorganismos con paredes celulares más resistentes. En ambos casos la obtención de ADN de calidad adecuada posibilitó la amplificación exitosa del gen 16S rRNA para bacterias y la región ITS para hongos. Por lo que, la ausencia de bandas en una muestra de miel tratada bajo las mismas condiciones, puede explicarse debido a sus propiedades fisicoquímicas o la presencia de inhibidores de la PCR (Utzeri et al., 2018). La miel de abeja sin aguijón tiene una alta osmolaridad como resultado de su alto contenido de azúcar lo que limita el crecimiento bacteriano (Esa et al., 2022). Además, su entorno ácido podría alterar el metabolismo de los microorganismos al interferir con las actividades enzimáticas y debilitar la integridad de las membranas (Ng et al., 2020). Estas condiciones contribuyen a la degradación del ADN microbiano o su presencia en concentraciones bajas lo que impide su detección molecular (*Figura 9*).

Figura 9

Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS y del gen 16S rRNA



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.

Análisis del protocolo optimizado entre grupos funcionales de miel

Finalmente, en la *Tabla 11* se describen las modificaciones realizadas en el protocolo inicial que permitieron la optimización del protocolo de extracción de ADN en muestras de miel de abejas sin aguijón.

Tabla 11

Resumen de las modificaciones realizadas en el protocolo inicial

Parámetro	Protocolo Inicial	Protocolo optimizado
<i>Volumen de RNAsa A</i>	5 µL	30 µL
<i>Tiempo de incubación en lisis</i>	90 minutos	30 minutos
<i>Orden de adición de enzimas en la lisis</i>	Adición de 1 mL de buffer de extracción CTAB, 5 µL de RNAsa A y 30 µL de Proteinasa K	1. 1 mL de buffer CTAB y 30 uL de PK, incubación 65°C, 200 RPM por 15 min. 2. Desactivación de PK, incubación a 95°C por 10 min. 3. Muestra a T° ambiente, 30 uL de RNAsa A, incubación 37°C, por 15 min.

De forma general, el protocolo optimizado permitió la extracción de ADN de 51 muestras de miel de abejas sin aguijón (*Tabla 12*). Para la evaluación del desempeño de extracción de ADN en el conjunto de mieles de abejas sin aguijón, las muestras se organizaron en tres

grupos. El primer grupo comprende el género *Melipona* sp. Este grupo de abejas son de mayor tamaño (9 a 12 mm) (Engel et al., 2023). Además, alcanzan una distancia de vuelo de 2 km que puede extenderse hasta 10 km (Nunes et al., 2020) y se distinguen por ser los únicos que utilizan el zumbido para la cosecha de polen (Martins et al., 2023).

Los géneros *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., y *Ptilotrigona* sp., conforman el segundo grupo de abejas robustas de tamaño medio (4.5 a 9 mm) (Engel et al., 2023), cuya distancia de vuelo oscila en torno a los 1.7 km (Araújo et al., 2004). Finalmente, el tercer grupo incluye a abejas de menor tamaño (4 a 5 mm) (Engel et al., 2023) que se agrupan en los géneros *Tetragonisca* sp. y *Nannotrigona* sp. Estos géneros se caracterizan por hábitos de forrajeo solitario (Martins et al., 2023) y distancias de vuelo limitado entre los 0.6 y 0.9 km (Nieuwstadt & Iraheta, 1996).

Tabla 12

Resultados de la cuantificación de ADN extraído en miel de abejas sin aguijón de los géneros Melipona sp., Scaptotrigona sp., Tetragona sp., Ptilotrigona sp. Tetragonisca sp., y Nannotrigona sp.

N° Grupo	Género	Muestra	Concentración de ADN (µg/mL)	Media + SD (µg/mL)	A260/230	A260/280
1	<i>Melipona</i> sp.	MPY1	18.5	10.13 ± 6.71	1.44	1.94
		MPY2	3.88		1.42	2.08
		MPY3	17.8		1.64	1.84
		MPY4	14.7		2.09	1.86
		MPY5	6.75		2.14	1.8
		MPY6	2.48		1.8	1.85
		MPY7	28.8		1.8	1.9
		MPF8	5.93		1.92	2
		MPH1	1.98		1.86	1.99
		MPH7	4.08		1.75	2.01
		MPE1	20.3		1.91	1.99

N° Grupo	Género	Muestra	Concentración de ADN (µg/mL)	Media + SD (µg/mL)	A260/230	A260/280
		MPE3	17.2		1.77	1.82
		MPVM1	7.8		1.89	2.08
		MEC2	3.65		2.17	2.09
		MEC3	9.03		1.89	2
		MEC5	6.95		1.97	2.12
		MEC6	18.5		2.2	1.73
		MEC7	8.65		1.61	1.94
		MEC8	8.52		1.4	1.76
		MEC9	3.95		1.21	2.05
		MIC1	14		1.96	1.81
		MIC2	5.45		2.05	1.9
		MG1	9.64		1.75	1.91
		MG2	4.4		2.04	1.75
		MG3	8.93		2.03	2.01
		MPC1	11.6		2.01	1.82
Trigonas Robustas						
2	Scaptotrigona sp.	SCY3	9.02		1.58	1.9
		SCY5	38.9		1.53	1.41
		SCY6	18.2		1.96	2.09
		SCY8	3.16		2.12	2.03
		SCF7	18.7	52.40 ± 78.61	1.83	2.15
		SCF8	19.1		1.86	2.01
	Tetragona sp.	TES1	48.3		2.1	1.95
		TED1	60.2		1.85	1.89
	Ptilotrigona sp.	PT1	256		2.07	1.95
Trigonas Pequeñas						
3	Tetragonisca sp.	TAY1	87.3		2.38	1.96
		TAY2	65.9		1.76	2
		TAY3	18.9		1.21	2.25
		TAY5	23.3		1.6	2.44
		TAY6	16.3		1.92	1.99
		TAY7	9.08	55.54 ± 52.65	1.54	2.05
		TAVM1	20.2		2.05	1.97
		TAU1	141		1.96	2.02
		TAU2	140		1.72	1.83
		TAU5	149		1.84	1.82
		TAU7	46.7		1.37	1.84

N° Grupo	Género	Muestra	Concentración de ADN (µg/mL)	Media + SD (µg/mL)	A260/230	A260/280
		TAS1	58.2		2.15	2.07
		TAS2	100		2.14	2.03
		TAC1	2.25		1.92	1.85
	<i>Nannotrigona</i> sp.	NAC1	4.25		1.81	1.89
		NCRY1	6.25		1.82	2.03

La *Figura 10* ilustra que, a partir de miel de abejas sin aguijón se obtuvieron rendimientos de ADN altos, pero con gran dispersión de datos para los grupos 2 y 3 de trigonas robustas y pequeñas que presentaron medias de 52.40 y 55.54 µg/mL, respectivamente. Estos grupos incluyen géneros como *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp., *Tetragonisca* sp y *Nannotrigona* sp.

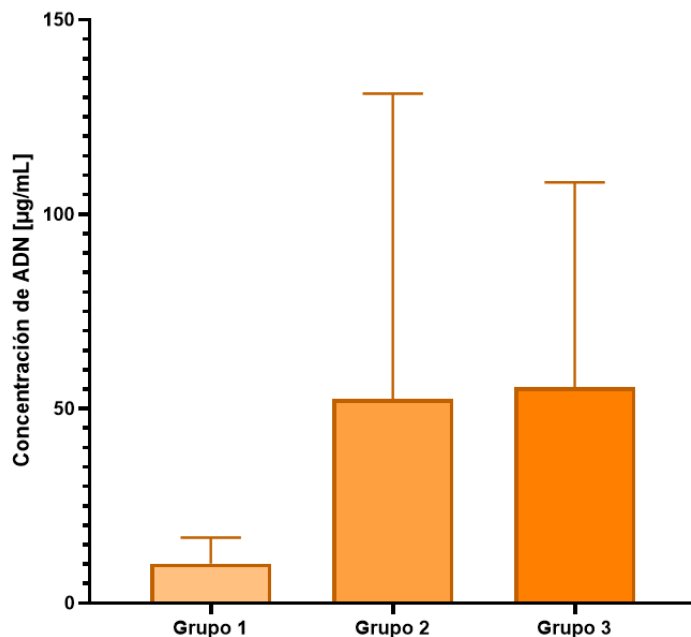
Por el contrario, las mieles del primer grupo donde se encuentra el género *Melipona* sp., mostraron un rendimiento de extracción de ADN bajo, con una media de 10.13 µg/mL pero una distribución de datos más uniforme. A pesar de ello, se ha reportado que los valores de concentración de ADN en muestras de miel de *Apis mellifera* extraídas con el método CTAB rondan los 9.5 a 39 µg/mL (Waiblinger et al., 2012). Por lo que, los resultados obtenidos para los tres grupos se ajustan y superan los rangos de referencia.

Se ha mencionado que los procesos naturales de las abejas depositan continuamente ADN en la miel (Bohmann et al., 2014). En este sentido, la variabilidad expuesta entre los grupos podría estar asociada a los hábitos de forrajeo de cada una de las especies. Se determinó que abejas sin aguijón apuntan a un comportamiento de forrajeo generalista (Ocaña et al., 2022; Sedivy et al., 2011), sin embargo, existen particularidades. Por ejemplo, *Tetragonisca angustula* visita mayor número de especies vegetales lo que le permite acumular

mayor biomasa genética (Martins et al., 2023). En comparación, las especies de *Melipona* muestran preferencias claras hacia algunos géneros de plantas como Solanaceae, Leguminosae y Melastomataceae (Ramalho et al., 1990; Vit et al., 2018), lo que se ve reflejado en los valores de concentración de ADN menores.

Figura 10

Valores de la media y desviación estándar de la concentración de ADN entre grupos de miel de abejas sin aguijón: *Melipona* sp., *Trigonas robustas* y *Trigonas pequeñas*.

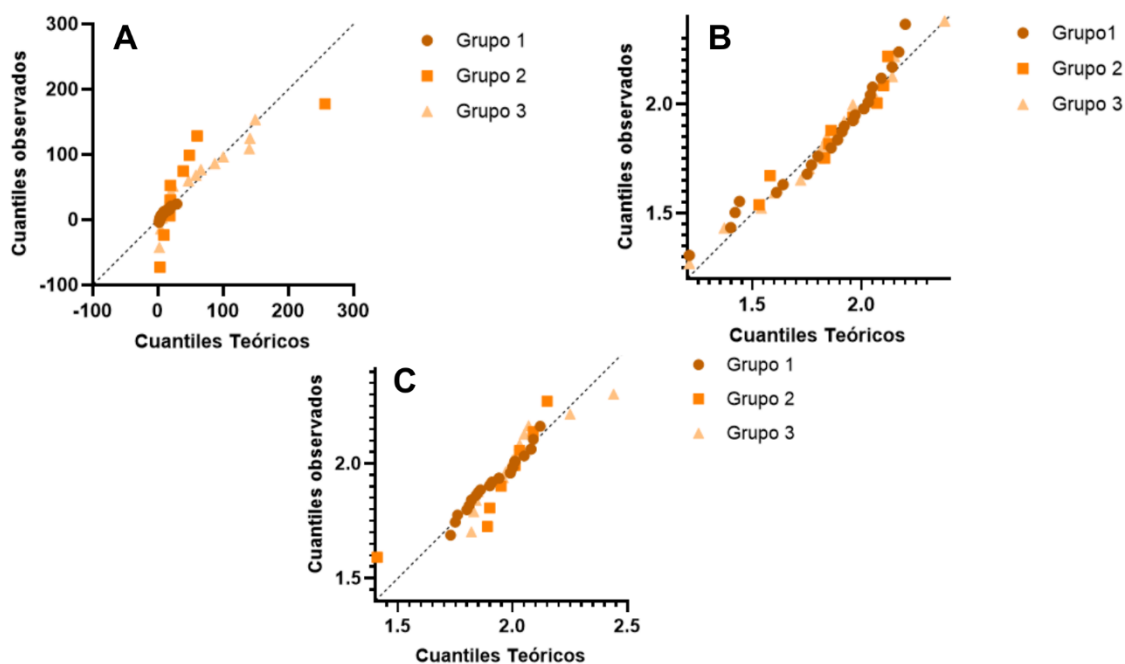


Nota. Grupo 1: *Melipona* sp., Grupo 2: *Trigonas robustas* (*Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp.), Grupo 3: *Trigonas pequeñas* (*Tetragonisca* sp. y *Nannotrigona* sp.)

Por otro lado, el análisis estadístico reveló que el índice de pureza 260/230 sigue una distribución normal ($W = 0.96$, $p = 0.1193$). Mientras que, la concentración de ADN y el índice de pureza 260/280 no siguen una distribución normal ($W = 0.61$, $p = < 0.0001$ y $W = 0.93$, $p = 0.0069$) (Figura 11).

Figura 11

Supuestos de normalidad para las variables según la agrupación de géneros de abejas sin aguijón



Nota. **A:** Concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$); **B:** Índice de pureza 260/230; **C:** Índice de pureza 260/280. Grupo 1: *Melipona sp.*, Grupo 2: Trigonas robustas (*Scaptotrigona sp.*, *Tetragona sp.*, *Ptilotrigona sp.*), Grupo 3: Trigonas pequeñas (*Tetragonisca sp.* y *Nannotrigona sp.*)

El supuesto de homocedasticidad lo cumplen ambos índices de pureza 260/230 ($F = 0.55$, $p = 0.5792$) y 260/280 ($F = 1.77$, $p = 0.1808$). Todos los grupos poseen medias cercanas correspondientes a valores óptimos de pureza 260/ 230 y 260/280 (Tabla 13). Por el contrario, la concentración de ADN no cumple el supuesto de homocedasticidad ($F = 13.13$, $p = < 0.0001$). Las mieles de los tres grupos de abejas sin aguijón muestran un rendimiento diferente entre ellas con respecto a la concentración de ADN ($H = 14.09$, $p = 0.0009$).

Las diferencias en la concentración de ADN entre los grupos de miel de abejas sin aguijón, no evidencian un sesgo en el protocolo de extracción. En cambio, pueden estar

asociadas a las características inherentes de las mieles. El ADN de la miel se deriva de todos los organismos que han contribuido de forma directa o indirecta en su proceso de producción y forman parte del ecosistema del nido (Ribani et al., 2022).

Tabla 13

Medias de los índices de pureza 260/230 y 260/280 según grupos de mieles de abejas sin aguijón

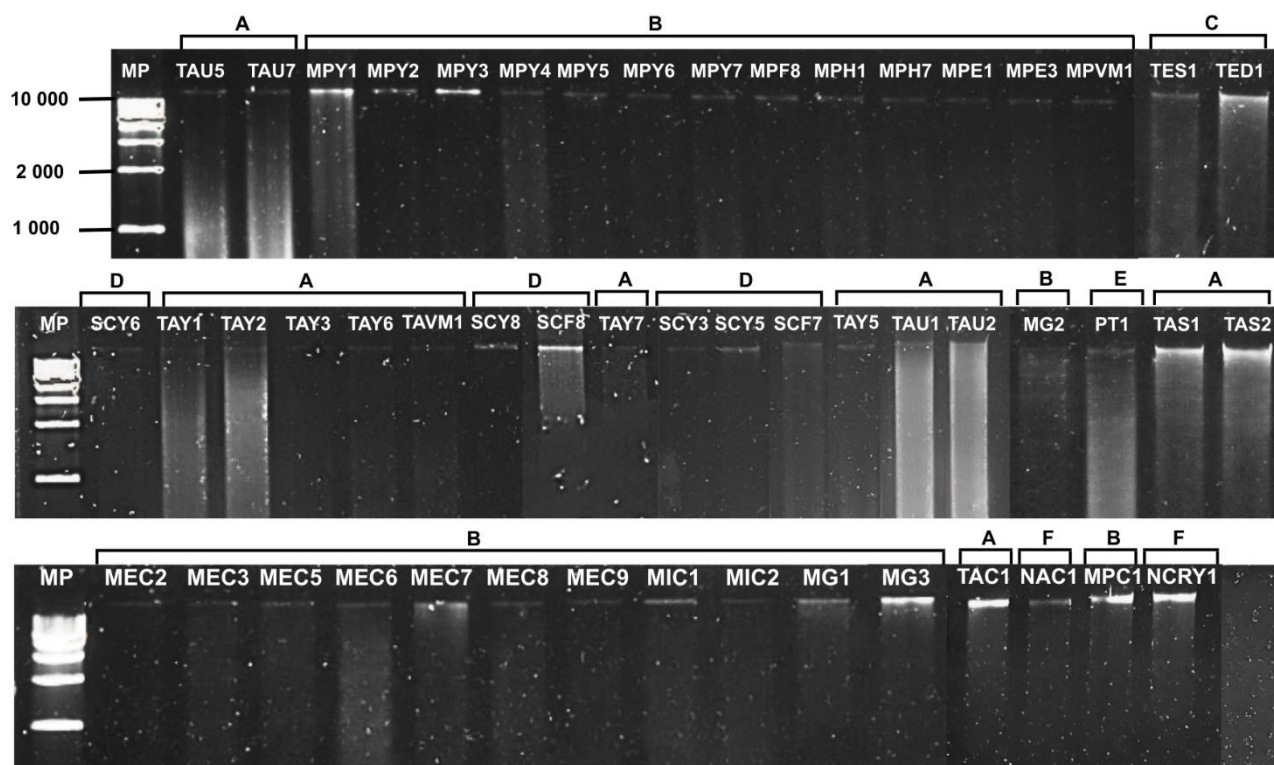
Grupo de miel de abejas sin aguijón	A260/230	A260/280
Grupo 1	$\bar{x} = 1.84$	$\bar{x} = 1.93$
Grupo 2	$\bar{x} = 1.88$	$\bar{x} = 1.93$
Grupo 3	$\bar{x} = 1.82$	$\bar{x} = 2.00$

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

En la *Figura 12* se observa que la mayoría de muestras exhibieron bandas de ADN integras y de alto peso molecular. No obstante, unas pocas mostraron degradación que se visualiza en forma de *smear* en el gel de integridad. A pesar del potencial de la miel, la extracción de ADN es un proceso complejo, debido a que, el ADN de miel de abejas sin aguijón suele estar altamente degradado (Gultom et al., 2025; Ribani et al., 2022). Las altas concentraciones de azúcares, polisacáridos y compuestos fenólicos pueden inhibir reacciones enzimáticas y por tanto, reducir el rendimiento y la calidad del ADN (Utzeri et al., 2018).

Figura 12

Gel de integridad de miel de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona* sp., *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp. *Tetragonisca* sp., y *Nannotrigona* sp



Nota. Los códigos de cada muestra corresponden a mieles de los siguientes géneros: **A.**

Tetragonisca sp., **B.** *Melipona* sp., **C.** *Tetragona* sp., **D.** *Scaptotrigona* sp., **E.** *Ptilotrigona* sp., **F.** *Nannotrigona* sp.

Determinación de la presencia de microorganismos mediante análisis molecular

La detección molecular efectiva de microorganismos en ADN extraído de muestras de miel de abeja sin aguijón de los géneros *Melipona* sp., *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp., *Tetragonisca* sp., y *Nannotrigona* sp. valida el método de extracción con CTAB. El éxito de la amplificación por PCR depende de ciertos factores, entre ellos, una concentración de ADN suficiente, condiciones de reacción óptimas (Soares et al., 2017) y bajo nivel de

contaminantes en matrices complejas como la miel que permiten la función efectiva de la enzima Taq Polimerasa (Gultom et al., 2025).

Por el contrario, una amplificación deficiente o nula es consecuencia de las bajas cantidades de ADN diana que se sitúan por debajo del límite de detección de la PCR (Ribani et al., 2022; Soares et al., 2015). Además, la presencia de inhibidores como polifenoles, enzimas, partículas de cera o ácidos orgánicos (Dodd et al., 2025), junto con la degradación del ADN de miel dificulta la amplificación de fragmentos grandes (Utzeri et al., 2018).

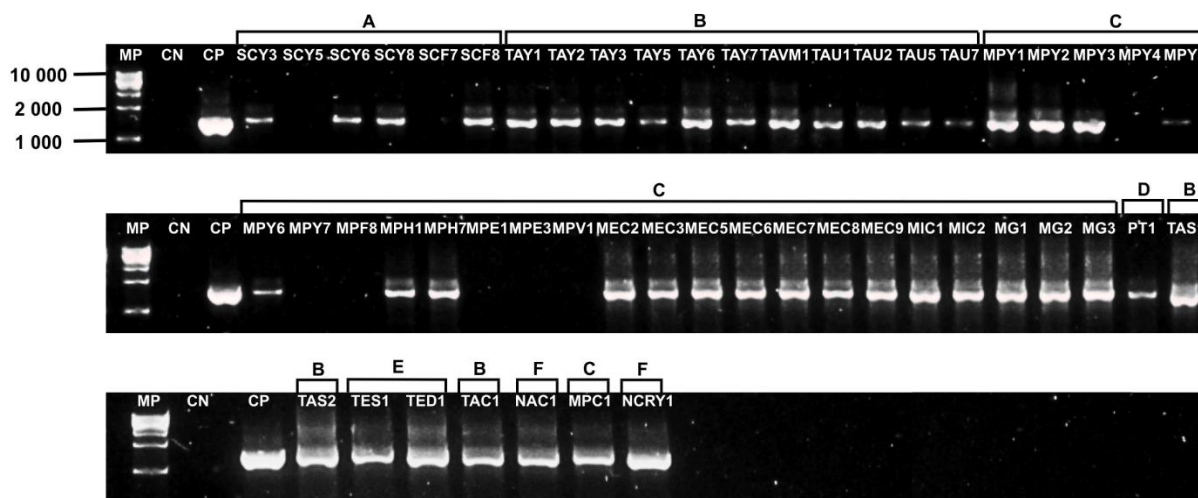
Identificación ADN bacteriano

Se confirmó la presencia de ADN bacteriano tras la amplificación exitosa del gen 16s rRNA en ADN extraído de muestras de miel de abejas sin aguijón. Se observó un amplicón de aproximadamente 1 500 pb (*Figura 13*). El resultado se obtuvo en 43 de las 51 muestras procesadas de todos los grupos combinados, lo que representa una prevalencia del 84.31% (*Figura 14*).

Esto está acorde a estudios que demuestran la presencia de comunidades bacterianas diversas. Por ejemplo, la secuenciación del gen 16S rRNA en mieles de abeja sin aguijón ha permitido la identificación de un total de 8 filos bacterianos, 71 familias, 155 géneros y 70 especies (Rosli et al., 2020), siendo el filo bacteriano más abundante los Firmicutes. Entre ellos, *Fructilactobacillus* spp., están relacionadas con la frescura, maduración y fermentación de la miel (Andrade et al., 2023).

Figura 13

Electroforesis en gel de agarosa del gen 16S rRNA



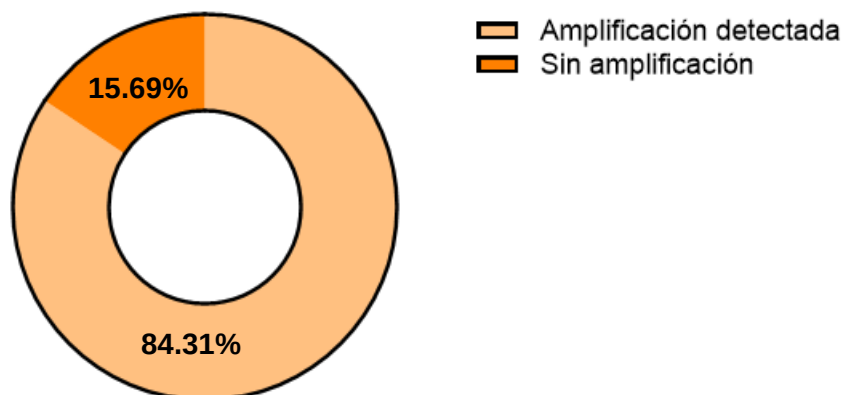
Nota. Los códigos de cada muestra corresponden a mieles de los siguientes géneros: **A.**

Scaptotrigona sp., **B.** *Tetragonisca* sp., **C.** *Melipona* sp., **D.** *Ptilotrigona* sp., **E.** *Tetragona* sp., **F.**

Nannotrigona sp.

Figura 14

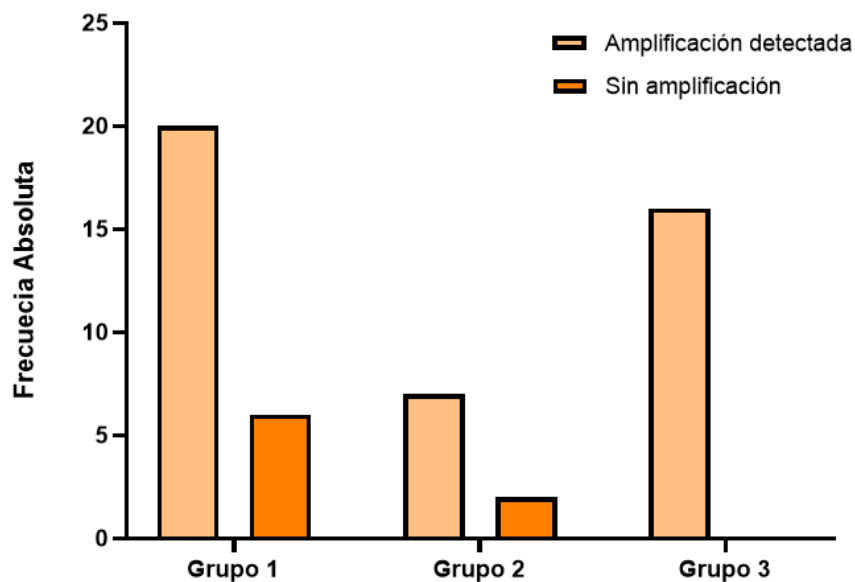
Prevalencia de la amplificación del gen 16s rRNA en muestras de ADN extraído a partir de miel de abejas sin aguijón de los géneros Melipona sp., *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp. *Tetragonisca* sp., y *Nannotrigona* sp.



Por otro lado, se determinó que no existen diferencias entre las prevalencias de bacterias de las mieles de los 3 grupos de abejas sin aguijón ($p = 0.1141$). La prevalencia de *Melipona* sp., ($n = 26$) fue del 76.92%, mientras que, el grupo de trigonas robustas ($n = 9$) y pequeñas ($n = 16$) evidenciaron una prevalencia superior del 77.77% y 100%, respectivamente (Figura 15). Los resultados sugieren que la presencia de bacterias en la miel se asocia principalmente a las actividades de forrajeo de las especies de abejas (Brudzynski, 2021). A pesar que las abejas del género *Melipona* sp., poseen capacidades de vuelo a mayores distancias en comparación con los otros dos grupos (Araújo et al., 2004; Nieuwstadt & Iraheta, 1996). Se ha determinado que los distintos géneros de abejas sin aguijón recolectan su alimento de fuentes vegetales similares (Ocaña et al., 2022), lo que permite la adquisición de microorganismos.

Figura 15

Prevalencia de la amplificación del gen 16s rRNA en grupos de miel 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.)

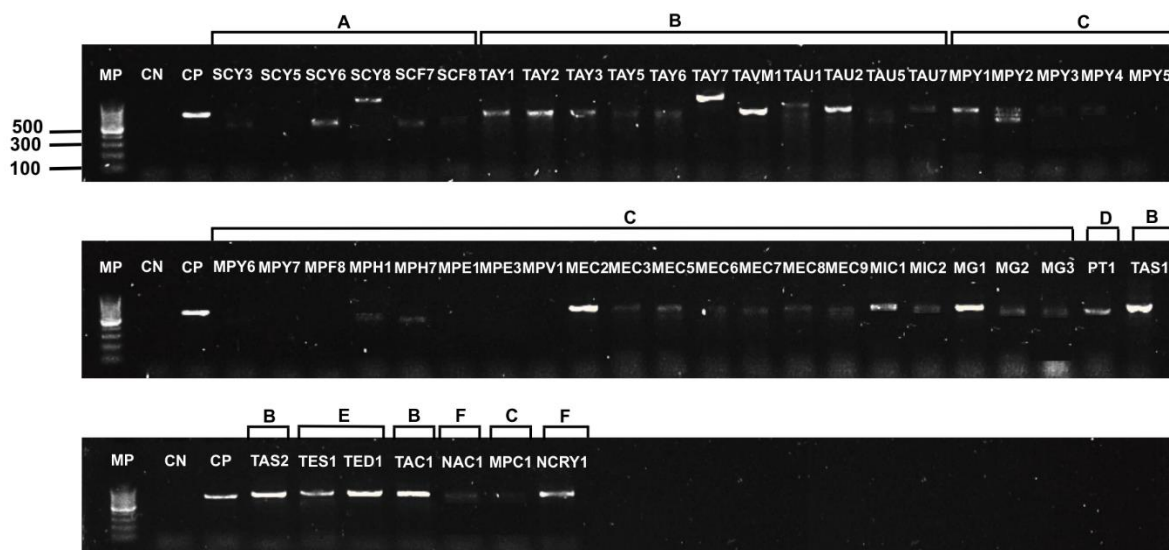
Identificación ADN fúngico

Se confirmó la presencia de ADN fúngica tras la amplificación exitosa de la región ITS en ADN extraído de muestras de miel de abejas sin aguijón. Se observó un amplicón de aproximadamente 700 pb (*Figura 16*). El resultado se obtuvo en 43 de las 51 muestras procesadas de todos los grupos combinados, lo que representa una prevalencia del 84.31% (*Figura 17*).

Los resultados concuerdan con la detección de ADN fúngico descrito previamente. Por ejemplo, *Monascus* sp., fue el hongo identificado mediante secuenciación ITS durante estudios en miel de abejas sin aguijón (Barbosa et al., 2017). Por otro lado, en mieles de 17 especies de abejas sin aguijón se determinaron 16 especies de levaduras (Echeverrigaray et al., 2021). Los géneros prevalentes fueron *Starmerella* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. que contribuyen a mejorar las características organolépticas y el valor nutricional pues actúan como microorganismos de descomposición (Snowdon & Cliver, 1996).

Figura 16

Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS



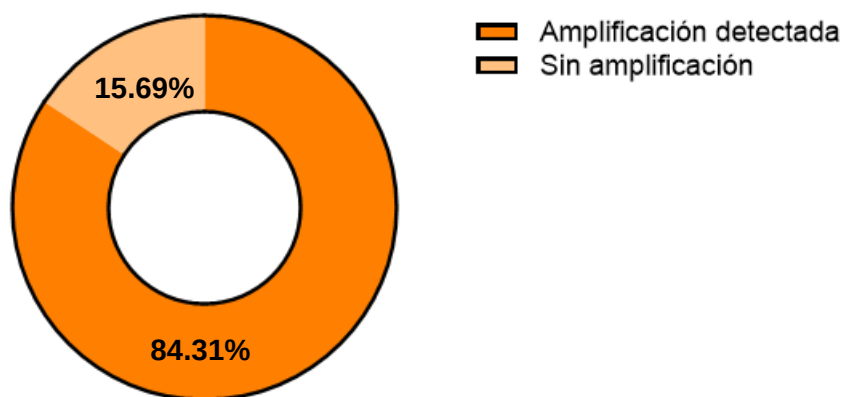
Nota. Los códigos de cada muestra corresponden a mieles de los siguientes géneros: **A.**

Scaptotrigona sp., **B.** *Tetragonisca* sp., **C.** *Melipona* sp., **D.** *Ptilotrigona* sp., **E.** *Tetragona* sp., **F.**

Nannotrigona sp.

Figura 17

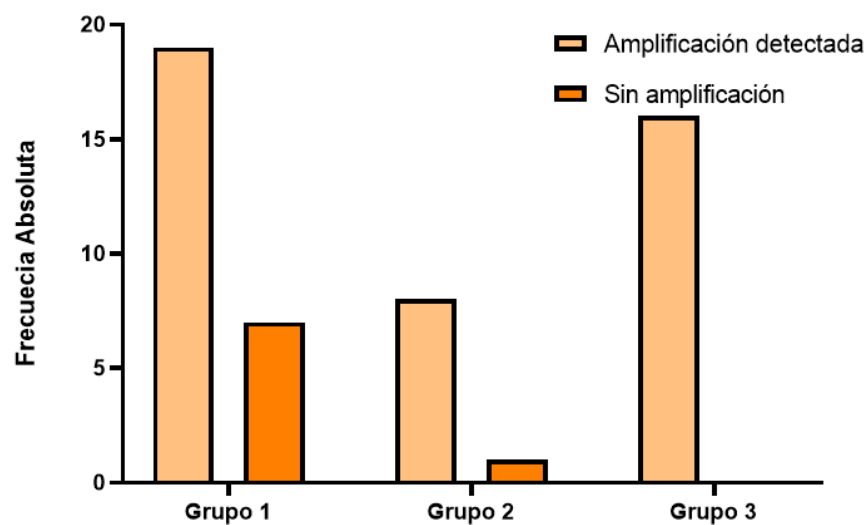
*Prevalencia de la amplificación de la región ITS en muestras de ADN extraído a partir de miel de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona* sp., *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp. *Tetragonisca* sp., y *Nannotrigona* sp.*



Por otro lado, se determinó que no existen diferencias entre las prevalencias de hongos en las mieles de los 3 grupos de abejas sin aguijón ($p = 0.0608$). La prevalencia de *Melipona* sp., ($n = 26$) fue del 73.08%. Mientras que, el grupo de trigonas robustas ($n = 9$) y pequeñas ($n = 16$) evidenciaron una prevalencia superior del 88.88% y 100%, respectivamente (*Figura 18*). Al igual que lo descrito para bacterias, a pesar de las distintas capacidades de vuelo de cada género, la exposición a fuentes florales similares permite la adquisición fúngica. En ese sentido, la miel se presenta como un rico reservorio de microbios cuya presencia está relacionada con la disponibilidad floral y el entorno en el que viven (Brudzynski, 2021; Ocaña et al., 2022).

Figura 18

Prevalencia de la amplificación de la región ITS en grupos de miel 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.)

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La modificación de variables en el protocolo de extracción de ADN basado en CTAB permitió preservar la integridad del ADN de alto peso molecular, así como minimizar la coextracción de compuestos inhibidores. Los cambios realizados hicieron posible la estandarización del método para la extracción de ADN a partir de matrices complejas como la miel de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona* sp., *Scaptotrigona* sp., *Tetragona* sp., *Ptilotrigona* sp., *Tetragonisca* sp., y *Nannotrigona* sp.

Se extrajo exitosamente ADN de 51 muestras de miel de abejas sin aguijón. El protocolo optimizado permitió obtener ADN de calidad con concentraciones adecuadas para los tres grupos. En cuanto al índice de pureza 260/280 se mantuvo cercano al valor óptimo (1.8 - 2) en los tres casos. La variabilidad expuesta en el rendimiento entre los grupos se asocia a la diferencia en los hábitos de forrajeo de cada especie.

Se determinó la presencia de ADN bacteriano y fúngico mediante la amplificación del gen 16S rRNA e ITS, respectivamente, en ADN extraído de miel de abejas sin aguijón. La prevalencia elevada de estos microorganismos demostró que la miel es un reservorio heterogéneo de microbios derivado de las actividades de forrajeo de las abejas.

La ausencia de amplificación en un número reducido de muestras ($n = 8$), sugiere una concentración de ADN diana por debajo del límite de detección de la PCR o la presencia de inhibidores residuales de la matriz.

La implementación de herramientas moleculares desde la extracción de ADN hasta la amplificación por PCR constituye un primer paso fundamental para el estudio del microbioma asociado a la miel de abejas sin aguijón.

Recomendaciones

Se propone evaluar métodos adicionales para la eliminación de inhibidores de la PCR en aquellas muestras con amplificación tenue o negativa, tales como, el uso de BSA o kits para la eliminación de compuestos inhibidores.

Se sugiere el uso de enzimas de restricción como método de tamizaje rápido. La técnica RFLP permite la caracterización inicial del microbioma presente en miel de abejas sin aguijón.

Se recomienda aplicar la secuenciación de nueva generación en los amplicones del gen 16S rRNA y la región ITS con el objetivo de obtener un perfil taxonómico completo del microbioma en miel de abejas sin aguijón.

Finalmente, se aconseja realizar el análisis molecular mediante el uso de marcadores botánicos específicos para identificar las especies vegetales que forman parte de la dieta de las abejas. La utilización de herramientas moleculares permitiría determinar con precisión el origen floral de la miel y correlacionar la dieta vegetal de las abejas sin aguijón con el microbioma detectado.

Capítulo VI: Referencias

- Ali, H., Abu Bakar, M. F., Majid, M., Muhammad, N., & Lim, S. Y. (2020). In vitro anti-diabetic activity of stingless bee honey from different botanical origins. *Food Research*, 4(5), 1421-1426. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.4\(5\).411](https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(5).411)
- Alves, V. F., Chaul, L. T., Bueno, G. C., Reinecke, I., Silva, T. C., Brito, P. V., & De Martinis, E. C. (2024). Associated bacterial microbiota of honey and related products from stingless bees as novel sources of bioactive compounds for biotechnological applications. *Current Opinion in Food Science*, 55, 101122. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101122>
- Anderson, K. E., & Copeland, D. C. (2024). The honey bee “hive” microbiota: Meta-analysis reveals a native and aerobic microbiota prevalent throughout the social resource niche. *Frontiers in Bee Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/frbee.2024.1410331>
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R., Walton, A., Jones, B. M., & Corby-Harris, V. (2013). Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*, 8(12), e83125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>
- Andrade, A., Hernández, H., Dorantes, L., Palmeros, B., Torres, R., Hernández, D., & Melgar, G. (2023). Honey characterization and identification of fructophilic lactic acid bacteria of fresh samples from *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona pectoralis*, *Plebeia llorentei*, and *Plebeia jatifomis* hives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1113920>
- Araújo, E. D., Costa, M., Chaud-Netto, J., & Fowler, H. G. (2004). Body size and flight distance in stingless bees (Hymenoptera: Meliponini): inference of flight range and possible

ecological implications. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia*, 64(3B), 563-568. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842004000400003>

Arnold, N. (2020). Las abejas y los meliponinos (abejas sin aguijón). *Fundación Alfredo Harp Helú Oaxaca*. <https://fahho.mx/las-abejas-y-los-meliponinos-abejas-sin-aguijon/>

Arnold, N., Vásquez, M., & Aldasoro, M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México; con catálogo de especies*. ECOSUR.
https://www.researchgate.net/publication/325742497_Las_abejas_sin_aguijon_y_su_cultivo_en_Oaxaca_Mexico_con_catálogo_de_especies

Avery, A. C., Olver, C., Khanna, C., & Paoloni, M. C. (2013). Molecular Diagnostics. En S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology (Fifth Edition)* (pp. 131-142). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00008-6>

Ávila, S., Beux, M. R., Ribani, R. H., & Zambiasi, R. C. (2018). Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 37-50.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.002>

Awaliyah, A. P., & Prayekti, E. (2024). Modification of CTAB incubation time in the isolation of DNA from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Indonesian Medical Laboratory and Science (JoIMedLabS)*, 5(2), 114-124. <https://doi.org/10.53699/joimedlabs.v5i2.224>

Badrulhisham, N. S. R., Ab Hamid, S. N. P., Ismail, M. A. H., Yong, Y. K., Muhamad Zakuan, N., Harith, H. H., Saidi, H. I., & Nurdin, A. (2020). Harvested locations influence the total phenolic content, antioxidant levels, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of stingless bee honey. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(4), 950-956. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.07.015>

- Bakar, M. F. A., Sanusi, S. B., Bakar, F. I. A., Cong, O. J., & Mian, Z. (2017). Physicochemical and Antioxidant Potential of Raw Unprocessed Honey From Malaysian Stingless Bees. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16(11), 888-894. <https://doi.org/10.3923/pjn.2017.888.894>
- Bąk-Badowska, J., Żeber-Dzikowska, I., Gworek, B., Kacprzyk, W., & Chmielewski, J. (2019). The role and significance of stingless bees (Hymenoptera: Apiformes: Meliponini) in the natural environment. *Environmental Protection and Natural Resources*, 30(2), 1-5. <https://doi.org/10.2478/oszn-2019-0005>
- Barbosa, R. N., Leong, S. L., Vinnere-Pettersson, O., Chen, A. J., Souza-Motta, C. M., Frisvad, J. C., Samson, R. A., Oliveira, N. T., & Houbraken, J. (2017, marzo 1). *Phylogenetic analysis of Monascus and new species from honey, pollen and nests of stingless bees*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.001>
- Begna, D., Motuma, G., Boki, S., Bekele, N., Kuru, T., & Chimdi, A. (2024). Physicochemical properties of stingless bees (*Meliponula beccarii*) honey in Dandi and Meta Robi districts of West Shewa zone, Ethiopia. *PLOS ONE*, 19(12), e0311725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311725>
- Bergmeyer, H., Klotzsch, H., Möllering, H., Beaucamp, K., & Nelböck, M. (1965). Biochemical Reagents. En *Methods of Enzymatic Analysis* (pp. 967-1037). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50166-3>
- Bhunja, A. K. (2014). One day to one hour: How quickly can foodborne pathogens be detected? *Future Microbiology*, 9(8), 935-946. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.61>
- Biluca, F. C., Braghini, F., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 50, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>

- Bluth, M. J., & Bluth, M. H. (2018). Molecular Pathology Techniques: Advances in 2018. *Clinics in Laboratory Medicine, Molecular Pathology: An Update*, 38(2), 215-236.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.03.004>
- Bogdanov, S. (2016). Honey Composition. *ResearchGate*.
https://www.researchgate.net/publication/304011775_Honey_Composition
- Bogo, G., Porrini, M. P., Aguilar-Monge, I., Aldea-Sánchez, P., de Groot, G. S., Velarde, R. A., Xolalpa-Aroche, A., & Vázquez, D. E. (2025). Current status of toxicological research on stingless bees (Apidae, Meliponini): Important pollinators neglected by pesticides' regulations. *Science of The Total Environment*, 959, 178229. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.178229>
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W., & Bruyn, M. de. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6), 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Brown, J. C., & Albrecht, C. (2001). The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. *Journal of Biogeography*, 28(5), 623-634. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00583.x>
- Brudzynski, K. (2021). Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. *Antibiotics*, 10(5), 551. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050551>
- Bueno, F. G. B., Kendall, L., Alves, D. A., Tamara, M. L., Heard, T., Latty, T., & Gloag, R. (2023). Stingless bee floral visitation in the global tropics and subtropics. *Global Ecology and Conservation*, 43, e02454. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02454>

- Camargo, J. M. F. de, & Pedro, S. R. de M. (1992). Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): A mini-review. *Apidologie*, 23(6), 509-522.
<https://doi.org/10.1051/apido:19920603>
- Cano, R., Borucki, M., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H., Poinar, G., & Pollard, K. (1994). Bacillus DNA in fossil bees: An ancient symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2164-2167. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2164-2167.1994>
- Cerqueira, A. E. S., Lima, H. S., Silva, L. C. F., Veloso, T. G. R., de Paula, S. O., Santana, W. C., & da Silva, C. C. (2024). Melipona stingless bees and honey microbiota reveal the diversity, composition, and modes of symbionts transmission. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(7), fiae063. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae063>
- Cholotío, P., Cholotío, Q., & Pérez, L. (2024). *Siete principios de meliponicultura practicados por productores de miel de abejas sin aguijón en Sololá. Seven principles of meliponiculture practiced by producers of honey from stingless bees in Solola*. 13, 111-125.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.14101694>
- Chun, J., & 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. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0>
- Chuttong, B., Chanbang, Y., Sringarm, K., & Burgett, M. (2016). Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*, 192, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.089>
- Codex Alimentarius. (2019). *Revised codex standard for honey,” in CODEX STAN 12-1981*. FAO/OMS, Codex Alimentarius Commission. https://www.researchgate.net/figure/Honey-standard-of-the-Codex-Alimentarius-Sandard-and-EU-Honey-Directive-important-new_tbl1_228505284

Crane, E. (1980). *A Book of Honey*. Oxford University Press.

Da Silva, I., da Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., de Novais, J. S., Soledade, L.

E. B., Lima, E. de O., de Souza, A. L., & de Souza, A. G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 141(4), 3552-3558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.072>

Da Silva, R., Magalhães-Guedes, K., De Souza, C., De Oliveira Alves, R., & Umsza, M. (2024).

Microbiological and physical-chemical characteristics of pollen and honey from stingless bees: A review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 6(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00268-y>

Davis, L., Dibner, M., & Battey, J. (1986). *Preparation of DNA from Eukaryotic Cells: General Method*.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-01082-7.50019-9>

de Camargo, J. M. F. (2013). Historical Biogeography of the Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) of the Neotropical Region. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 19-34). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_2

De Paula, G. T., Menezes, C., Pupo, M. T., & Rosa, C. A. (2021). Stingless bees and microbial interactions. *Current Opinion in Insect Science, Ecology * Parasites/Parasitoids/Biological control*, 44, 41-47. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>

Dodd, S., Kevei, Z., Karimi, Z., Kumar, J. J. S., Koidis, A., & Anastasiadi, M. (2025). Tracing the botanical origins of UK heather honey by relative quantification of plant DNA. *Npj Science of Food*, 9(1), 196. <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00561-1>

Dudley, E. G. (2001). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 5th Edition. *Emerging Infectious Diseases*, 28(1), 267. <https://doi.org/10.3201/eid2801.211862>

- Dymond, K., Celis-Diez, J. L., Potts, S. G., Howlett, B. G., Willcox, B. K., & Garratt, M. P. D. (2021). The role of insect pollinators in avocado production: A global review. *Journal of Applied Entomology*, 145(5), 369-383. <https://doi.org/10.1111/jen.12869>
- Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Foresti, L., Schwarz, L. V., Rocha, R. K. M., da Silva, G. P., Moreira, J. P., & Delamare, A. P. L. (2021). Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109200. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109200>
- Engel, M., Rasmussen, C., Ayala, R., & Oliveira, F. F. de. (2023). Stingless bee classification and biology (Hymenoptera, Apidae): A review, with an updated key to genera and subgenera. *ZooKeys*, 1172, 239-312. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1172.104944>
- Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q., Anderson, K. E., Barribeau, S. M., Chandler, J. A., Cornman, R. S., Dainat, J., de Miranda, J. R., Doublet, V., Emery, O., Evans, J. D., Farinelli, L., Flenniken, M. L., Granberg, F., Grasis, J. A., Gauthier, L., Hayer, J., Koch, H., ... Dainat, B. (2016). The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio*, 7(2), 10.1128/mbio.02164-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.02164-15>
- Erazo, A. G. C., Tapia, M. F. B., Rivera, S. A. G., & Moposita, D. A. M. (2023). La meliponicultura: Una alternativa de conservación y aprovechamiento sostenible de abejas nativas en la Amazonía ecuatoriana. *Tesla Revista Científica*, 3(1), e157-e157. (2020-). <https://doi.org/10.55204/trc.v3i1.e157>
- Esa, N. E. F., Ansari, M. N. M., Razak, S. I. A., Ismail, N. I., Jusoh, N., Zawawi, N. A., Jamaludin, M. I., Sagadevan, S., & Nayan, N. H. M. (2022). A Review on Recent Progress of Stingless Bee Honey and Its Hydrogel-Based Compound for Wound Care Management. *Molecules*, 27(10), 3080. <https://doi.org/10.3390/molecules27103080>

- Evahelda, Setiawan, I., Aini, S. N., & Afriani, Z. L. (2021). Chemical characteristics of kelulut honey (*Trigona* sp.) in Bangka Tengah District, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 694(1), 012072. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/694/1/012072>
- Farrell, R. (2017). *Creating a Ribonuclease-Free Environment*. 55-74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804678-4.00002-6>
- Foddai, A. C. G., & Grant, I. R. (2020). Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(10), 4281-4288. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10542-x>
- Freifelder, D. (1978). *The DNA molecule: Structure and properties; original papers, analyses, and problems*. WH Freeman.
https://discovered.ed.ac.uk/discovery/fulldisplay/alma99172953502466/44UOE_INST:44UOE_VU2
- Fu, Y., Chen, Q., & Jia, L. (2021). RNase-free RNA removal and DNA purification by functionalized magnetic particles. *Separation and Purification Technology*, 267, 118616. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118616>
- Gadge, A. S., Shirsat, D. V., Soumia, P. S., Pote, C. L., Pushpalatha, M., Pandit, T. R., Dutta, R., Kumar, S., Ramesh, S. V., Mahajan, V., & Karuppaiah, V. (2024). Physiochemical, biological, and therapeutic uses of stingless bee honey. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1324385>
- García, V., Zaragoza, C., Ramirez, J., Guerrero, A., & Ruiz, C. (2015). Caracterización rápida de la biodiversidad usando morfometría geométrica: Caso de estudio con abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del sur de Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 7(1). <https://doi.org/10.18272/aci.v7i1.226>

- Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113-118.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10(3), 269-274. <https://doi.org/10.1051/apido:19790304>
- Grimaldi, P., Céspedes, F., & Cilla, G. (2021). No solo de las flores. Recolección de resinas por abejas en Santiago del Estero. *ResearchGate*, (3).
https://www.researchgate.net/publication/348756425_No_solo_de_las_flores_Recoleccion_de_resinas_por_abejas_en_Santiago_del_Estero_Pagina_22_FOLIUM_Relatos_botanicos_Numero_3
- Grüter, C., Kärcher, M. H., & Ratnieks, F. L. W. (2011). The Natural History of Nest Defence in a Stingless Bee, *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae), with Two Distinct Types of Entrance Guards. *Neotropical Entomology*, 40, 55-61. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000100008>
- Guertler, P., Eicheldinger, A., Muschler, P., Goerlich, O., & Busch, U. (2014). Automated DNA extraction from pollen in honey. *Food Chemistry*, 149, 302-306.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.129>
- Gultom, E. S., Hafzari, R., Silitonga, M., & Dasopang, E. S. (2025). Enhanced DNA extraction from trigona honey: A low-volume of sample, high-purity approach for molecular research. *Polish Journal of Natural Sciences*, 40(3), 133-142. <https://doi.org/10.31648/pjns.11421>
- Handayani, E., Nandariyah, Cahyani, V. R., & Parjanto. (2021). The Effect of Weight and Incubation Time in DNA Quality of Kepel (*Stelechocarpus burahol*) Leaves. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 752(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/752/1/012017>

- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- Hrncir, M., Jarau, S., & Barth, F. G. (2016). Stingless bees (Meliponini): Senses and behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, 202(9), 597-601. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1117-9>
- Jain, S. A., Jesus, F. T. de, Marchioro, G. M., & Araújo, E. D. de. (2013). Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology*, 33, 753-756. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013000400022>
- Junicke, H., Abbas, B., Oentoro, J., van Loosdrecht, M., & Kleerebezem, R. (2014). Absolute Quantification of Individual Biomass Concentrations in a Methanogenic Coculture. *AMB Express*, 4, 35. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0035-x>
- Karabagias, I. K., Louppis, A. P., Kontakos, S., Drouza, C., & Papastephanou, C. (2018). Characterization and Botanical Differentiation of Monofloral and Multifloral Honeys Produced in Cyprus, Greece, and Egypt Using Physicochemical Parameter Analysis and Mineral Content in Conjunction with Supervised Statistical Techniques. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018(1), 7698251. <https://doi.org/10.1155/2018/7698251>
- Karuppaiah, V., Maruthadurai, R., Das, B., Soumia, P. S., Gadge, A., Pote, C., Shirsat, D., Pandit, T., Sawant, S., Ramesh, S. V., & Mahajan, V. (2024). Predicting the potential distribution of stingless bee, *Tetragonula iridipennis* in India using MaxEnt and CMIP6 climate projections. *Scientific Reports*, 14(1), 31946. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-83419-y>
- Katumo, D. M., Liang, H., Ochola, A. C., Lv, M., Wang, Q.-F., & Yang, C.-F. (2022). Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. *Plant Diversity*, 44(5), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2022.01.005>

- Kauserud, H. (2023). ITS alchemy: On the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. *Fungal Ecology*, 65, 101274. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101274>
- Kek, S. P., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Tan, S. W., & Chua, L. S. (2017). Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S2723-S2738. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1359185>
- Kim, M., & Chun, J. (2014). Basada en el gen ARNr 16S. En M. Goodfellow, I. Sutcliffe, & J. Chun (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 41, pp. 61-74). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>
- Lachance, M.-A., Dobson, J., Wijayanayaka, D. N., & Smith, A. M. E. (2010). The use of parsimony network analysis for the formal delineation of phylogenetic species of yeasts: *Candida apicola*, *Candida azyma*, and *Candida parazyza* sp. nov., cosmopolitan yeasts associated with floricolous insects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 97(2), 155-170. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9399-3>
- Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schöne-Michling, M., Chisholm, J., & Broll, H. (2010). Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry, Food Authenticity & Traceability*, 118(4), 979-986.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.063>
- Layek, U., & Karmakar, P. (2025). Distribution Patterns, Nesting Ecology and Nest Characteristics of the Stingless Bees (*Tetragonula pagdeni* Schwarz) in West Bengal, India. *Conservation*, 5(4), 63. <https://doi.org/10.3390/conservation5040063>
- Lee, K., Steinhauer, N., Travis, D. A., Meixner, M. D., Deen, J., & vanEngelsdorp, D. (2015). Honey bee surveillance: A tool for understanding and improving honey bee health. *Current Opinion in Insect Science, Social Insects * Vectors and Medical and Veterinary Entomology*, 10, 37-44.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.009>

- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- Lindauer, M. (1976). The social behavior of the bees: A comparative study. *Insectes Sociaux*, 23(2), 199-200. <https://doi.org/10.1007/BF02223852>
- Macedo, C. R. da C., Aquino, I. de S., Borges, P. de F., Barbosa, A. da S., & Medeiros, G. R. de. (2020). Nesting behavior of stingless bees. *Ciência Animal Brasileira*, 21, e. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-58736>
- Machado, A. A., Almeida, L. B. de, Sancho, M. T., & Pascual, A. (2018). Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57(1), 5-37. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338444>
- Maftuchah, Winaya, A., & Zainudin, A. (2015). *Teknik dasar analisis biologi molekuler*. Deepublish.
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39(4), 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.11.012>
- Martins, A. C., Proença, C. E. B., Vasconcelos, T. N. C., Aguiar, A. J. C., Farinasso, H. C., de Lima, A. T. F., Faria, J. E. Q., Norrana, K., Costa, M. B. R., Carvalho, M. M., Dias, R. L., Bustamante, M. M. C., Carvalho, F. A., & Keller, A. (2023). Contrasting patterns of foraging behavior in neotropical stingless bees using pollen and honey metabarcoding. *Scientific Reports*, 13(1), 14474. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41304-0>

- McFrederick, Q. S., Wcislo, W. T., Taylor, D. R., Ishak, H. D., Dowd, S. E., & Mueller, U. G. (2012). Environment or kin: Whence do bees obtain acidophilic bacteria. *Molecular Ecology*, 21(7), 1754-1768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05496.x>
- Melia, S., Juliyarsi, I., Kurnia, Y. F., Aritonang, S. N., Rusdimansyah, R., Sukma, A., Setiawan, R. D., Pratama, Y. E., & Supandil, D. (2024). Profile of stingless bee honey and microbiota produced in West Sumatra, Indonesia, by several species (Apidae, Meliponinae). *Veterinary World*, 17(4), 785-795. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.785-795>
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Contrera, F. A. F. L., Venturieri, G. C., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2013). The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik (Eds.), *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 153-171). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World*. JHU Press.
- Moure, J., Urban, D., & Melo, G. (2007). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region*. Sociedade Brasileira de Entomologia. https://www.researchgate.net/publication/315495801_Catalogue_of_Bees_Hymenoptera_Apoidea_in_the_Neotropical_Region
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), 263-273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Nanda, V., Sarkar, B. C., Sharma, H. K., & Bawa, A. S. (2003). Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 613-619. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00062-0)

- Nascimento, A. S. do, Marchini, L. C., Carvalho, C. A. L. de, Araújo, D. F. D., Olinda, R. A. de, & Silveira, T. A. da. (2015). Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). *Chemical Science International Journal*, 139-149.
<https://doi.org/10.9734/ACSJ/2015/17547>
- Ng, W.-J., Sit, N.-W., Ooi, P. A.-C., Ee, K.-Y., & Lim, T.-M. (2020). The Antibacterial Potential of Honeydew Honey Produced by Stingless Bee (*Heterotrigona itama*) against Antibiotic Resistant Bacteria. *Antibiotics*, 9(12), 871. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120871>
- Nicholls, C. I., & Altieri, M. A. (2013). Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(2), 257-274.
<https://doi.org/10.1007/s13593-012-0092-y>
- Nieuwstadt, M. G. L. van, & Iraheta, C. E. R. (1996). Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae). *Apidologie*, 27(4), 219-228.
<https://doi.org/10.1051/apido:19960404>
- Nordin, A., Sainik, N. Q. A. V., Chowdhury, S. R., Saim, A. B., & Idrus, R. B. H. (2018). Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 91-102.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>
- Nunes, P., Costa, L., Campbell, A. J., Arruda, H., Contrera, F. A. L., Teixeira, J. S. G., Gomes, R. L. C., Pessin, G., Pereira, D. S., de Souza, P., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2020). Radiofrequency identification (RFID) reveals long-distance flight and homing abilities of the stingless bee *Melipona fasciculata*. *Apidologie*, 51(2), 240-253. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00706-8>
- Ocaña, J. S., Liria, J., Vizuite, K., Cholota, C., Espinoza, F., Saegerman, C., Martin-Solano, S., Debut, A., & Ron-Román, J. (2022). Pollen preferences of stingless bees in the Amazon region and

southern highlands of Ecuador by scanning electron microscopy and morphometry. *PLOS ONE*, 17(9), e0272580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272580>

Olaitan, P. B., Adeleke, O. E., & Ola, I. O. (2007). Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3), 159-165.
<https://doi.org/10.5555/afhs.2007.7.3.159>

Olivieri, C., Marota, I., Rollo, F., & Luciani, S. (2012). Tracking Plant, Fungal, and Bacterial DNA in Honey Specimens. *Journal of Forensic Sciences*, 57(1), 222-227. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01964.x>

Özbek, Ö. (2024). Molecular Markers Used to Reveal Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships in Crop Plants. *OBM Genetics*, 8(4), 1-25. <https://doi.org/10.21926/obm.genet.2404274>

Paluoja, P., Vaher, M., Teder, H., Krjutškov, K., Salumets, A., & Raime, K. (2025). Honey bulk DNA metagenomic analysis to identify honey biological composition and monitor honey bee pathogens. *NPJ Science of Food*, 9, 91. <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00464-1>

Pham, V. H. T., & Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, 30(9), 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.007>

Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7378-7387. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14>

Promnuan, Y., Kudo, T., & Chantawannakul, P. (2009). Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1685-1689.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-0051-1>

Rajasekhar, A., Lynn, N., Das, S., & Suganthan, P. N. (2017). Computing with the collective intelligence of honey bees – A survey. *Swarm and Evolutionary Computation*, 32, 25-48.

<https://doi.org/10.1016/j.swevo.2016.06.001>

Ramalho, M., Kleinert-Giovannini, A., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (1990). Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: A review. *Apidologie*, 21(5), 469-488.

<https://doi.org/10.1051/apido:19900508>

Rauber, N. R., Jany, K. D., & Pfeleiderer, G. (1978). Ribonuclease A digestion by proteinase K. *Zeitschrift Fur Naturforschung. Section C, Biosciences*, 33(9-10), 660-663.

Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science, Ecology • Parasites/Parasitoids/Biological control*, 26, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>

Real, N., Rivera, J. E., Alcántara, G., Rojas, G., Morales, A. P., Pérez-Sato, J. A., Real-Luna, N., Rivera-Hernández, J. E., Alcántara-Salinas, G., Rojas-Malavasi, G., Morales-Vargas, A. P., & Pérez-Sato, J. A. (2022). Las abejas sin aguijón (Tribu Meliponini) en los agroecosistemas de América Latina. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(2), 331-344.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2866>

Reinhard, D., Atmowidi, T., Juliandi, B., Kahono, S., Reinhard Jesajas, D., Atmowidi, T., Juliandi, B., & Kahono, S. (2023). The characteristics of stingless bee nests (Apidae: Meliponini) in the Cycloop Mountain Nature Reserve, Indonesia. *Revista de Biología Tropical*, 71(1).

<https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop>.

Ribani, A., Taurisano, V., Utzeri, V. J., & Fontanesi, L. (2022). Honey Environmental DNA Can Be Used to Detect and Monitor Honey Bee Pests: Development of Methods Useful to Identify *Aethina*

tumida and *Galleria mellonella* Infestations. *Veterinary Sciences*, 9(5), 213.

<https://doi.org/10.3390/vetsci9050213>

Ribani, A., Utzeri, V. J., Taurisano, V., & Fontanesi, L. (2020). Honey as a Source of Environmental DNA for the Detection and Monitoring of Honey Bee Pathogens and Parasites. *Veterinary Sciences*, 7(3), 113. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030113>

Robinson, K. M., & Baudier, K. M. (2024). Stingless bee foragers experience more thermally stressful microclimates and have wider thermal tolerance breadths than other worker subcastes. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 12. <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1405459>

Roller, C. (2024, febrero 26). *Caste System of Honey Bees | Honey Bee Caste Development*. Buddha Bee Apiary. <https://www.buddhabeeapiary.com/blog/caste-system-honey-bees>

Rosli, F. N., Hazemi, M. H. F., Akbar, M. A., Basir, S., Kassim, H., & Bunawan, H. (2020). Stingless Bee Honey: Evaluating Its Antibacterial Activity and Bacterial Diversity. *Insects*, 11(8), 500. <https://doi.org/10.3390/insects11080500>

Roubik, D. W., Smith, B. H., & Carlson, R. G. (1987). Formic acid in caustic cephalic secretions of stingless bee, *Oxytrigona* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Chemical Ecology*, 13(5), 1079-1086. <https://doi.org/10.1007/BF01020539>

Rutter, B. (2022). *Levels of Bee Hierarchy: Drone Bee, Worker Bee, and Queen Bee*. <https://bestbees.com/bee-hierarchy/>

Salis, S., Spano, N., Ciulu, M., Floris, I., Pilo, M. I., & Sanna, G. (2021). Electrochemical Determination of the “Furanic Index” in Honey. *Molecules*, 26(14), 4115. <https://doi.org/10.3390/molecules26144115>

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 2). CSHL Press.

- Sanchez, I., Remm, M., Frاسquilho, S., Betsou, F., & Mathieson, W. (2015). How Severely Is DNA Quantification Hampered by RNA Co-extraction. *Biopreservation and Biobanking*, 13(5), 320-324. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0008>
- Sanz, S., Gradillas, G., Jimeno, F., Perez, C., & Juan, T. (1995). Fermentation Problem in Spanish North-Coast Honey. *Journal of Food Protection*, 58(5), 515-522. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.5.515>
- Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., & Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, 11(3), e11517. <https://doi.org/10.1002/aps3.11517>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, Fungal Barcoding Consortium Author List, Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Sedivy, C., Müller, A., & Dorn, S. (2011). Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: Evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*, 25(3), 718-725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01828.x>
- Seeley, T. (1986). *Libro Honeybee Ecology: A Study of Adaptation in Social Life*. <https://www.buscalibre.ec/libro-honeybee-ecology-a-study-of-adaptation-in-social-life-monographs-in-behavior-and-ecology/9780691273600/p/63519477>
- Shackleton, K., Al Toufailia, H., Balfour, N. J., Nascimento, F. S., Alves, D. A., & Ratnieks, F. L. W. (2015). Appetite for self-destruction: Suicidal biting as a nest defense strategy in *Trigona*

stingless bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(2), 273-281.

<https://doi.org/10.1007/s00265-014-1840-6>

Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1), 1-26. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00970-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00970-1)

Soares, D. B. S., Duarte, L. P., Cavalcanti, A. D., Silva, F. C., Braga, A. D., Lopes, M. T. P., Takahashi, J. A., & Vieira-Filho, S. A. (2017). *Psychotria viridis*: Chemical constituents from leaves and biological properties. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89, 927-938.

<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160411>

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2015). Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control, Recent Advances of Food Analysis*, 48, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.035>

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072-1100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12278>

Souza, E. C. A., Menezes, C., & Flach, A. (2021). Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): A review of quality control, chemical profile, and biological potential. *Apidologie*, 52(1), 113-132. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00802-0>

Suntiparapop, K., Prapaipong, P., & Chantawannakul, P. (2012). Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (*Tetragonula leaviceps*). *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 45-52. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.06>

Toledo, E., Peña Chora, G., Hernandez, V. M., Lormendez, C. C., Toribio, J., Romero, Y., & León, R. (2022). The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie*, 53(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>

- Trindade, M., Lima, R., Silva, T., Domingos, A., & Freitas, F. (2023). Exotic and predatory: A spider (Araneae: Salticidae) that preys on native stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) in Brazil. *ResearchGate*, 49(4), 701-706. <https://doi.org/10.35249/rche.49.4.23.04>
- Utzeri, V. J., Ribani, A., Schiavo, G., Bertolini, F., Bovo, S., & Fontanesi, L. (2018). Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey. *Food Control*, 86, 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.033>
- Utzeri, V., Ribani, A., & Fontanesi, L. (2018). Authentication of honey based on a DNA method to differentiate *Apis mellifera* subspecies: Application to Sicilian honey bee (*A. m. siciliana*) and Iberian honey bee (*A. m. iberiensis*) honeys. *Food Control*, 91, 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.010>
- Vaidya, C., Fitch, G., Martinez, G. H. D., Oana, A. M., & Vandermeer, J. (2023). Management practices and seasonality affect stingless bee colony growth, foraging activity, and pollen diet in coffee agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 353, 108552. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2023.108552>
- Venturieri, G. (2014). Defensive repertoire of the stingless bee *Melipona flavolineata* Friese (Hymenoptera: Apidae). *ResearchGate*, 6(4), 541-546. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.541-546>
- Vit, P., Pedro, S. R. M., Maza, F., Ramírez, V. M., & Frisone, V. (2018). Diversity of Stingless Bees in Ecuador, Pot-Pollen Standards, and Meliponiculture Fostering a Living Museum Meliponini of the World. En P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. W. Roubik (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 207-227). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_15

Vossler, F. G. (2019). *Meliponas, abejas melíferas sin aguijón*.

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/100454>

Waiblinger, H.-U., Ohmenhaeuser, M., Meissner, S., Schillinger, M., Pietsch, K., Goerlich, O., Mankertz, J., Lieske, K., & Broll, H. (2012). In-house and interlaboratory validation of a method for the extraction of DNA from pollen in honey. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 7(3), 243-254. <https://doi.org/10.1007/s00003-012-0774-z>

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., & Lane, D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>

Xiong, Z. R., Sogin, J. H., & Worobo, R. W. (2023). Microbiome analysis of raw honey reveals important factors influencing the bacterial and fungal communities. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1099522>

Zhang, M., Wu, J., Shi, Z., Cao, A., Fang, W., Yan, D., Wang, Q., & Li, Y. (2022). Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens. *Molecules*, 27(23), 8262. <https://doi.org/10.3390/molecules27238262>

Zhao, X., Zhong, J., Wei, C., Lin, C.-W., & Ding, T. (2017). Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8, 580.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>

Zulhendri, F., Perera, C. O., Chandrasekaran, K., Ghosh, A., Tandean, S., Abdulah, R., Herman, H., & Lesmana, R. (2022). Propolis of stingless bees for the development of novel functional food and nutraceutical ingredients: A systematic scoping review of the experimental evidence. *Journal of Functional Foods*, 88, 104902. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104902>