



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Relación del estado de deterioro de colonias de abejas meliponinas *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) con los microorganismos asociados

MARIA CAMILA MEJIA TORRES

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia
2020

**RELACIÓN DEL ESTADO DE COLONIAS DE ABEJAS
MELIPONINAS *Tetragonisca angustula* (HYMENOPTERA,
APIDAE, MELIPONINI) CON MICROORGANISMOS
ASOCIADOS**

MARIA CAMILA MEJIA TORRES

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias- Entomología

Directora:

Adriana Ortiz Reyes Dr. Biología

Codirectora:

Magaly Romero Tabarez, Dr.rer.nat.

Línea de Investigación:

Ecología de insectos

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en Sustancias activas y Biotecnología – SaBio

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2020

Dedicatoria

Este trabajo que con tanto esfuerzo he completado, se lo dedico a mi mamá y mi hermana, por haberme acompañado en cada decisión tomada, por darme todo el apoyo que necesitaba en los momentos más difíciles y por sonreír y celebrar cada logro alcanzado en este camino.

Agradecimientos

Después de tanto tiempo persiguiendo este sueño de completar este paso en mi vida profesional, hoy tengo que agradecer a mucha gente que estuvo a lo largo del camino y que me brindó conocimiento, fortaleza, alegrías y, por qué no, tristezas.

Gracias mamita por ser mi eterna alcahueta, por confiar en mi decisión de tomar este rumbo y por alentarme en cada paso he dado.

A mi hermanita, gracias por creer en mí, ser una amiga incondicional, por mostrarme tu visión de la vida y por acompañar a mamá todo el tiempo. Me das una tranquilidad enorme y me lleno de orgullo al ver cuanto has crecido.

A mi papá y mis tíos Ricardo, Graham y Clara Consuelo por estar siempre pendientes de mí y apoyarme de mil y un maneras.

En Medellín tengo que agradecerle a mi directora Adriana Ortiz Reyes, por darme la oportunidad desde el primer día de crecer como profesional, de ser mi luz y guía y por depositar toda su confianza en mí. No solo le tengo toda mi admiración, sino que me siento muy satisfecha por haber construido con ella una gran relación dentro y fuera de la universidad.

A mi codirectora Magally Romero y al grupo SABIO y sus integrantes por abrirme la puerta al mundo de la biotecnología y los microorganismos y por toda la ayuda en el laboratorio. En especial Miller Alí y María Fernanda, mis compañeros de batalla durante todos estos años, a quienes quiero con toda el alma y les deseo todo lo mejor en su vida personal y profesional.

Al Dr. Allan Smith Pardo y Dr. Juan Manuel Rosso, por su apoyo incondicional, por sus sugerencias y preguntas, por su tiempo y dedicación. Gran oportunidad el haber podido trabajar con ustedes.

Al profesor Guillermo Correa por sus valiosos aportes estadísticos y a la profesora Sandra Uribe por entregarme su conocimiento y abrirme las puertas a lo que es ahora mi realidad profesional.

A la Hacienda Agroecológica el Paraíso y todos sus trabajadores por estar interesados en apoyar este trabajo y por todo el soporte y hospitalidad prestados.

A la fundación Eva Crane (Eva Crane Trust) por el gran aporte para poder finalizar esta investigación con éxito.

A mis amigas Luz Adriana, Luisa Fernanda, Sandra y Sara, que fueron parte muy importante durante los últimos años, me acompañaron y me aguantaron hasta en mis peores momentos. Las llevo en el corazón y les agradezco cada vino, cada canción, cada carimañola, cada momento.

A la Universidad Nacional de Colombia, en particular la sede Medellín, por abrirme las puertas y brindarme las herramientas para alcanzar este logro.

A todas y cada una de las personas con las que compartí todos estos años, gracias por hacerme una mejor persona, por mostrarme mis errores y celebrar cada triunfo a mi lado.

¡Gracias universo, gracias vida!

Resumen

Colonias de *Tetragonisca angustula* en Cimitarra, Santander presentaron señales progresivas de deterioro que conllevó a su muerte. Dado que tras realizar la evaluación correspondiente para múltiples patógenos conocidos para otras especies de abejas no fue posible identificar el causante del daño, se decidió hacer un análisis extensivo sobre los microorganismos asociados a las colonias de *T. angustula* y establecer si existe relación entre el avance del deterioro y algún patógeno cultivable o una posible disbiosis en la colonia. Se aislaron bacterias de adultos, inmaduros y partes estructurales del nido utilizando métodos de siembra convencionales, se morfotiparon las colonias obtenidas y aquellas más abundantes y con aparente relación con el deterioro de las colonias fueron identificadas por técnicas moleculares. Se publica un listado detallado de las bacterias identificadas por cada fuente muestreada como aporte al conocimiento de la microbiota de esta especie de abeja sin aguijón. Se observó en todas las fuentes aumento en la abundancia bacteriana principalmente de Actino bacterias, *Bacillus* y Enterobacterias durante la etapa temprana del deterioro seguida por una reducción de esta en la etapa tardía, aunque los análisis estadísticos no permitieron establecer si alguna de las bacterias actúa como patógeno de la colonia o si estos cambios en la microbiota son los causantes del deterioro. Bacterias como *L. saprophyticus* o *L. massiliensis* son potencialmente patógenas, y sería interesante estudiar más a fondo su acción sobre *T. angustula*. Dado que los microorganismos que aumentaron tienen propiedades antifúngicas y que los hongos pueden establecer interacción con las bacterias, se recomienda evaluar las muestras para determinar la presencia de hongos que puedan estar modificando la microbiota de las abejas o causando cambios en el comportamiento de la colonia.

Palabras clave:

Abejas sin aguijón, bacterias cultivables, disbiosis, meliponinos, patógeno, deterioro

Title: Relationship of the state of deterioration of colonies of meliponin bees *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) with their associated microorganisms

Abstract

Colonies of *Tetragonisca angustula* in Cimitarra, Santander showed progressive signs of deterioration that led to their death. Given that after carrying out the corresponding evaluation for multiple known pathogens for other species of bees it was not possible to identify the cause of the damage, it was decided to carry out an extensive analysis on the microorganisms associated with the colonies of *T. angustula* and to establish if there is a relationship between the advance of deterioration and some cultivable pathogen, or a possible dysbiosis in the colony. Bacteria were isolated from adults, immature and structural parts of the nest using conventional seeding methods, the colonies obtained were morphotyped and those more abundant and with an apparent relationship with the deterioration of the colonies were identified by molecular techniques. A detailed list of the bacteria identified by each sampled source is published as a contribution to the knowledge of the microbiota of this species of stingless bee. An increase in bacterial abundance was observed in all the sampled sources, mainly of Actinobacteria, Bacillus and Enterobacteria during the early stage of deterioration followed by a reduction of this in the late stage, although the statistical analysis did not allow to establish whether any of the bacteria acts as a pathogen of the colony or if these changes in the microbiota are causing the deterioration. Bacteria such as *L. saprophyticus* or *L. massiliensis* are potentially pathogenic, and it would be interesting to further study their action on *T. angustula*. Given that some microorganisms that increased have antifungal properties and that fungi can establish interaction with bacteria, it is recommended to evaluate the samples to determine the presence of fungi that may be modifying the microbiota of the bees or causing changes in the behaviour of the colony.

Keywords:

Stingless bees, culturable bacteria, dysbiosis, meliponinae, pathogen, deterioration

Contenido

	Pág.
1. Estado del Arte	4
1.1 Meliponicultura en Colombia y Abejas sin aguijón.....	4
1.2 <i>Tetragonisca angustula</i>	7
1.2.1 Clasificación Taxonómica.....	7
1.2.2 Biología y Ecología.....	7
1.3 Microorganismos asociados a insectos.....	10
1.4 Patógenos de abejas, disbiosis y transporte de colonias.....	14
2. Materiales y Métodos	17
2.1 Deterioro de las colonias de <i>Tetragonisca angustula</i>	17
2.2 Área de estudio.....	19
2.2.1 Hacienda Agroecológica el Paraíso (HEP).....	19
2.2.2 Municipio de Santa Bárbara.....	21
2.3 Toma de muestra en campo.....	22
2.4 Procesamiento de muestras en laboratorio.....	26
2.5 Análisis de datos.....	27
3. Resultados y discusión	28
3.1 Aislamientos e identificaciones.....	28
3.1.1 Actinobacterias.....	35
3.1.2 Firmicutes.....	38
3.1.3 Gamaproteobacteria.....	43
3.2 Variación de las abundancias bacterianas (UFC) según Fuente de aislamiento.....	46
3.2.1 Microorganismos asociados a las obreras de abejas angelitas (<i>T. angustula</i>).....	49
3.2.2 Microorganismos asociados al alimento.....	59
3.2.3 Microorganismos aislados de diferentes estructuras de la colmena.....	67
3.3 Microorganismos aislados de muestras asociadas a señales del deterioro.....	75
3.4 Características de los grupos bacterianos más comunes en las muestras.....	76
3.5 Variación de abundancias bacterianas en el tiempo.....	80
4. Conclusiones y recomendaciones	85

4.1	Conclusiones	85
4.2	Recomendaciones	86
5.	Bibliografía	86
6.	Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1: Caja de cartón con piquera externa.....	5
Figura 2: Guadua ocupada por <i>T. angustula</i>	5
Figura 3: Caja racional de madera decorativa	6
Figura 4: Caja racional de madera sencilla.....	6
Figura 5. Ubicación geográfica Hacienda el Paraíso	20
Figura 6: Ubicación específica HEP en google maps	20
Figura 7: Terrenos HEP.....	21
Figura 8: Ubicación del municipio Santa Bárbara.....	22
Figura 9: Remoción de opérculo con aguja para extracción de larva y pupa	24
Figura 10: Aspiración de abejas pecoreadoras.....	25
Figura 11: Extracción de intestino de abejas sin agujón	25
Figura 12: Macerado de muestras en laboratorio	26
Figura 13 Proporción de grupos bacterianos encontrados en los aislamientos de <i>T. angustula</i>	30
Figura 14 Abundancias y frecuencias de los géneros bacterianos identificados en las diferentes etapas del deterioro. (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía y M: muerte).....	35
Figura 15 Presencia de <i>I. variabilis</i> en las fuentes por cada estado de deterioro. (piquera[PI], abeja pecoreadora[AP], abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], larva [L], pupa [P], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], detritos [B], resina [R], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ], disco joven [DJ], disco viejo [DV] en etapa temprana [P], etapa tardía [T] y muerte [M]).....	37
Figura 16 Presencia de <i>M. paraoxidans</i> en las fuentes por cada estado de deterioro. (piquera [PI], abeja pecoreadora [AP], abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], detritos [B], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ] en etapa temprana [P], etapa tardía [T] y muerte [M])	37
Figura 17 Frecuencia de los géneros identificados en cada estado de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía, M: muerte).....	40
Figura 18 Comparación de la abundancia de bacterias por orden en las dos zonas de muestreo, siendo Cimitarra las colonias correspondientes a la Hacienda el Paraíso.....	46
Figura 19 Diversidad de géneros bacterianos presentes en colonias de la Hacienda el Paraiso (Cimitarra) y Santa Bárbara.....	46

Figura 20 MDS para los aislamientos por estado de deterioro en donde las distancias entre los puntos representan la similitud en los valores de abundancia	47
Figura 21 Similitud de la diversidad bacteriana encontrada en las diferentes fuentes en colonias sanas (disco joven [DJ], disco viejo [DV], abeja pecoreadora [AP], miel [M], intestino de juvenil [IJ], pote de miel [PM], pupa [P], abeja adulta [AA], detritos [B], intestino de pecoreadora [IP] larva [L], polen [PO], intestino de adulta [IA], pote de polen [PP], abeja juvenil [AJ], involucro [I], piquera [PI], cera[CE], resina [R])	48
Figura 22 Similitud de especies bacterianas aisladas de fuentes tomadas de colonias clasificadas con deterioro temprano (abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora [AP], detritos [B], disco joven [DJ], disco joven engrosado [DJeng], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP] larva [L], miel [M], pupa [P], piquera [PI], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R])	49
Figura 23 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas adultas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	52
Figura 24 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas juveniles (AJ) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	52
Figura 25 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas pecoreadoras completas (AP) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	53
Figura 26 Diversidad y abundancia de bacterias encontradas por fuente (abeja adulta (AA), pecoreadora (AP) y juvenil (AJ)) en cada uno de los estados de deterioro (S. sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	53
Figura 27 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de adultas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	56
Figura 28 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de juveniles en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	57
Figura 29 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de pecoreadoras en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	57
Figura 30 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de larvas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	58
Figura 31 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de pupas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	59
Figura 32 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de miel (M) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	61
Figura 33 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Pote de Miel (PM) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	63
Figura 34 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Polen en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	64

Figura 35 Similitud (Jaccard) de las muestras de polen (PO), abejas pecoreadoras (PO), abejas adultas (AA) y abejas juveniles (AJ) en colonias sanas (A) y en colonias con presencia de deterioro (B)	66
Figura 36 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Pote de Polen en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)	67
Figura 37 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de detritos (B) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa Temprana, T: Etapa Tardía).....	68
Figura 38 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de disco joven (DJ) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)	70
Figura 39 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de disco viejo (DV) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)	71
Figura 40 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de involucro (I) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía).....	72
Figura 41 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Resina en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía).....	73
Figura 42 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de la piquera (PI) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía).....	74
Figura 43 Diversidad y abundancia bacteriana en las muestras relacionadas con características del deterioro sustancia blanca húmeda [CBH], sustancia blanca seca [CBS], celda no desarrollada [CND], celda con opérculo raro [COR], disco joven engrosado [DJ eng], larva muerta [LM] y larva vecina [LV]).....	75
Figura 44 Abundancia relativa de las bacterias identificadas en los estados de deterioro (S=Sanas, P=Etapa temprana, T=Etapa tardía y M=Muerte).....	81
Figura 45 Abundancias relativas de bacterias aisladas de la misma colonia, en dos muestreos diferentes. Las barras azules corresponden al primer muestreo y las rojas al segundo (P=Etapa temprana, T=Etapa tardía)	81
Figura 46 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonias muestreadas dos veces en el tiempo pero que no tuvieron avance del deterioro	82
Figura 47-49 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonias muestreadas dos veces en el tiempo	84

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1 Total de aislamientos y morfotipos por fuente muestreada sistemáticamente en todos los estados de deterioro. (piquera[PI], abeja pecoreadora[AP], abeja adulta [AA}, abeja juvenil [AJ], larva [L], pupa [P], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], detritos [B], resina [R], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ], disco joven [DJ], disco viejo [DV])	28
Tabla 2 Total de aislamientos y morfotipos en muestras extra encontradas en colonias con diferente estado de deterioro (celda vecina [CV], larva vecina [LV], larva muerta [LM], larva real [LR], reina [RE], celda fallida [CF], materia blanca húmeda [CBH], materia blanca seca [CBS], cera [CE], celda no desarrollada [CND], celda con opérculo raro [COR], disco joven engrosado [DJE]).....	29
Tabla 3 Descripción fenotípica de los morfotipos bacterianos aislados	31
Tabla 4 Especies bacterianas aisladas de colonias sanas y su presencia por fuente. (abeja adulta [AA}, abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora[AP], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP], larva [L], pupa [P], miel [M], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R], detritos [B], piquera[PI], disco viejo [DV], involucro [I], Cera [CE], disco joven [DJ]),	44
Tabla 5 Especies bacterianas aisladas de colonias con presencia del deterioro y su presencia por fuente. Se señala dentro del recuadro naranja las especies que también fueron aisladas en colonias sanas. (abeja adulta [AA}, abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora[AP], detritos [B], materia blanca seca [CBS], celda vecina [CV], disco joven [DJ], disco joven engrosado [DJ eng], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP], larva [L], larva reina [LR], larva vecina [LV], miel [M], pupa [P], piquera[PI], , pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R], ,).....	45
Tabla 6 Especies de bacterias aisladas de abejas completas o solo de los intestinos de abejas de colonias sanas y colonias en etapa temprana (P) y etapa tardía (T) del deterioro. Se señalan en gris las especies compartidas por las abejas completas e intestinos en las diferentes colonias, y se marcan con una estrella naranja las cuatro especies de bacterias encontradas solo en abejas de colonias con presencia de deterioro.....	51
Tabla 7 Variación (%) de las abundancias de las especies de <i>Bacillus</i> aisladas de las diferentes fuentes. Las celdas están coloreadas de acuerdo con el porcentaje de cambio de las abundancias bacterianas al comparar entre fuentes de colonias sanas y colonias	

con presencia del deterioro progresivo según la escala de colores. Las bacterias que desaparecen se muestran en color rojo, aquellas que presentaron ningún o poco cambio en amarillo y aquellas que sufrieron un gran incremento de abundancia en verde. Las celdas con estrella corresponden a especies que fueron aisladas de muestras con presencia de deterioro pero que estaban ausentes en las colonias sanas (abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora [AP], detritos [B], disco joven [DJ], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP], larva [L], miel [M], piquera [PI], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R]). 77

Introducción

El uso de abejas nativas sin aguijón (Hymenoptera, Meliponinae), se conoce dentro de las labores de los pueblos indígenas de países como Guatemala, México y Brasil en época prehispánica, y un poco en Colombia (Falchetti & Nates-Parra, 2002; Hogue, 1993; Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005; Villanueva-G et al., 2005). Aunque la abeja melífera, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) ha sido la especie más explotada desde su introducción por los colonos, en algunos departamentos del país se ha registrado un incremento en los últimos años del uso de abejas sin aguijón para producción, dado que a su miel se le atribuyen características especiales de sabor, incluso algunas propiedades medicinales, además de que su explotación exige costos bajos de implementación y manejo y generan un producto de alto valor (Gamboa & Figueroa, 2009; Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005).

Las especies de abejas meliponinas anidan en gran variedad de sustratos como troncos de árboles, suelo o cualquier cavidad que les brinde protección (Nogueira-Neto, 1997). Cerca de 120 han sido reportadas para Colombia y aproximadamente 34 géneros son utilizados como productores de miel en meliponarios (Nates-Parra & Rosso-Londoño, 2013). *Tetragonisca angustula*, es una de las especies más utilizadas para la producción de miel de alta calidad, principalmente por su amplio rango de distribución, por su abundancia y por ser una de las especies más comunes aún en áreas urbanas (Nates-Parra, 2005; Nates-Parra & Rosso-Londoño, 2013).

Gracias a los múltiples esfuerzos de difusión y socialización en las comunidades acerca de los beneficios económicos y medioambientales de la meliponicultura, se ha generado un crecimiento que no necesariamente va de la mano con el conocimiento de las especies ni con la legislación, principalmente en actividades como la recolección, transporte, manipulación y extracción de miel en meliponarios o en estado de semi-domesticación (Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005). El desconocimiento por parte de algunos criadores

en cuanto a las condiciones de manejo de las colonias, puede generar problemas nutricionales o enfermedades en las abejas, como lo han mostrado trabajos en Australia (Shanks, 2015), y el traslado de colonias fuera del área de donde son originarias, podría estar generando problemas de conservación y sanitarios por nuevas condiciones adversas.

Para las abejas sin aguijón, no se conocen suficientemente las asociaciones con microorganismos al mismo nivel de detalle que se conocen estas asociaciones en *A. mellifera*, *Bombus atratus* y *Bombus terrestris* (Hymenoptera-Apidae) (Engel & Moran, 2013; Fürst et al., 2014; Gamboa et al., 2015; Martinson et al., 2011; Meeus et al., 2011), en las que se ha observado que la presencia de levaduras, mohos y bacterias incide en su estado nutricional, en la capacidad de defensa inmune y en el estado de la colonia, más aún en el caso de los insectos sociales que facilitan la asociación de una microbiota particular que no es posible encontrar en insectos solitarios (Cariveau et al., 2014; Engel & Moran, 2013; Gilliam, 1997; Kapheim et al., 2015).

Desde el año 2014 se ha documentado una serie de síntomas de deterioro de las colonias de *T. angustula* que finalmente termina en la muerte de estas; este hallazgo se dio en la región de Cimitarra – Santander en la reserva natural “Hacienda Agroecológica El Paraíso” además de recientes reportes en Antioquia y la Costa Atlántica (Rosso-Londoño com. Pers). Lo observado se caracteriza por deformidad en los discos del panal, muerte de las larvas, disminución o falta de alimento, entre otros signos y la disminución progresiva de la población de abejas hasta la muerte de las colonias (Rosso-Londoño, en prep.). A pesar del uso de diferentes metodologías para diagnosticar la causa, los análisis efectuados a la fecha no habían arrojado resultados que evidenciaran la presencia de algún patógeno conocido en bacterias y virus, aunque la probabilidad de que algún microorganismo fuera el causante no había sido descartada, quizá por la alteración o desproporción de las especies dentro de la microbiota nativa que puede conducir a una enfermedad.

Por todo lo anterior se propuso comparar los microorganismos cultivables de colonias en diferentes estados del síndrome categorizados previamente (sanas, etapa temprana, etapa tardía y muertas) para establecer si el deterioro evidenciado tiene relación directa con la presencia o ausencia de ellos.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si existe relación entre el estado del deterioro en las colonias de *T. angustula* y algún patógeno bacteriano cultivable o una posible disbiosis en la colonia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar los microorganismos asociados a las colonias de *T. angustula* en diferentes estados.
- 2) Determinar si el estado de las colonias de *T. angustula* se encuentra relacionadas con la presencia o ausencia de microorganismos.
- 3) Establecer si el estado de las colonias de *T. angustula* se encuentra relacionada con el número relativo de microorganismos presentes en las muestra con presencia de deterioro en comparación con el número relativo de microorganismos presentes en una muestra sana

HIPÓTESIS

El estado de las colonias de *Tetragonisca angustula* con evidencia de deterioro, está influenciado por alteraciones en los microorganismos de la colmena o en las abejas.

1. Estado del Arte

1.1 Meliponicultura en Colombia y Abejas sin aguijón

La meliponicultura o crianza de abejas sin aguijón, es una actividad que en Latinoamérica ha sido desarrollada tradicionalmente, principalmente en México, Brasil, Costa Rica, El Salvador, Ecuador y Guatemala con fines religiosos, alimentarios y medicinales (Hogue, 1993; Martínez-Fortun et al., 2018; Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005; Villanueva-G et al., 2005), a diferencia de la apicultura con la especie *Apis mellifera*, que fue traída al continente en el siglo XVII durante la conquista, alcanzando Brasil en 1838 y Colombia y otros países en 1857 (Hogue, 1993). Colombia no tiene una historia tan marcada en cuanto al uso de abejas sin aguijón, pero se conoce que los indígenas Uwa en la Sierra Nevada del Cocuy conservan por tradición colonias de meliponinas para obtención de miel y otros productos con objetivo alimenticio, para orfebrería entre otros usos, y están incluidas en sus mitos como símbolo de la creación del universo: “esferas de colores” generadoras de vida (Falchetti & Nates-Parra, 2002)

En la actualidad se han incrementado los esfuerzos para estimular el uso de abejas meliponinas para la industria apícola con programas de educación, en los que se les explica a la población objetivo las ventajas de la cría que se caracteriza por la facilidad de manejo, bajo costo de implementación, mantenimiento y mano de obra, generando un ingreso económico complementario (venta de productos y panales) y un gran beneficio ambiental en la polinización a los cultivos y conservación de los bosques (Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005). Una de las mayores dificultades a enfrentar en nuestro país es que aún la normatividad y la metodología para el desarrollo de las actividades con abejas sin aguijón no es muy clara, eso sin contar con el reducido número de estudios existentes sobre este grupo, lo que hace necesario combinar los conocimientos tradicionales con los elementos culturales y ambientales de cada región, e impulsar la investigación a todos los niveles (Nates-Parra & Rosso-Londoño, 2013).

Tradicionalmente en el campo los nidos son extraídos para ser llevados cerca de las casas de campesinos e indígenas, causando disturbios no sólo en la colmena sino en el ecosistema originario, por ejemplo al talar los árboles en donde nidificaban naturalmente

(Baquero & Stamatti, 2007). Esta actividad aún está vigente, aunque se ha implementado un método de captura menos invasivo y destructivo, como botellas, cajas de cartón (Figura 1), guaduas (Figura 2), cajas racionales decoradas: cajas de madera decorada con alzas internas (Figura 3) y cajas racionales sencillas (Figura 4), colocadas con atrayente como nido trampa, aprovechando que algunas especies de abejas sin aguijón de interés productivo se acoplan fácilmente a cualquier espacio, nidificando en cualquier cavidad. Se han reportado algunas especies de abejas sin aguijón en cementerios (Nates-Parra, Rodríguez-C, & Vélez, 2006), nidos de otros insectos (Michener, 1990), recipientes artificiales hechos por el hombre (Nates-Parra, 2005) e incluso bajo tierra en túneles de hasta 4 metros de profundidad conservando como característica, una entrada en forma de tubo recto, embudo o un orificio por donde sólo puede pasar una abeja a la vez (Nates-Parra, 2001b; Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005).



Figura 1: Caja de cartón con piquera externa



Figura 2: Guadua ocupada por *T. angustula*



Figura 3: Caja racional de madera decorativa



Figura 4: Caja racional de madera sencilla

Las abejas sin aguijón, conocidas como abejas meliponinas, con cerca de 400 especies (Nates-Parra, 2001a) se caracterizan por una reducción en la venación de las alas, un peine en el margen apical externo de la tibia posterior y la modificación del aguijón reducido o atrofiado (Wille, 1983). La ausencia del usual mecanismo de defensa ha llevado a que se utilicen otro tipo de estrategias como la construcción de entradas estrechas al nido, el uso de resinas (Lehmberg et al., 2008), enredarse en el pelo del atacante o mordiendo hasta su propia muerte (Shackleton et al., 2014).

La subfamilia Meliponinae se divide en las tribus Meliponini y Trigonini con alrededor de 52 géneros y más de 300 especies identificadas (Magalhaes-Freitas, 2003). Las abejas pertenecientes a la tribu meliponini están distribuidas por todo el trópico y subtrópico (Michener, 2007) con una alta concentración de especies en centro y sur américa contando con entre ocho a 21 géneros (Nates-Parra, 2001a, 2001b). Según Nates (2001b, 2005) en Colombia se encuentran aproximadamente 14 géneros, nueve subgéneros y 120 especies, distribuidos desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm. Según lo reportado por Nates-Parra y Rosso-Londoño (2013) se conocen al menos 34 especies de abejas sin aguijón de 12 géneros utilizadas actualmente para actividades de meliponicultura, distribuidos en 16 departamentos y 43 localidades de tipo rural, semiurbano y urbano, que podrían aumentar al muestrear en los departamentos no incluidos en su estudio. Las cinco especies más utilizadas son: *Tetragonisca angustula* en 13 departamentos, *Melipona (Michmelia)*

eburnea en 9 departamentos, *Scaptotrigona* spp. en 6 departamentos, *Frieseomelitta* spp. y *Nannotrigona mellaria* en 5 departamentos.

1.2 *Tetragonisca angustula*

1.2.1 -Clasificación Taxonómica

Phyllum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hymenoptera

Suborden: Apocrita

Superfamilia: Apoidea

Familia: Apidae

Tribu: Meliponini

Género: *Tetragonisca* Moure, 1946

Especie: *Tetragonisca angustula*

Sinonimia: *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula* (Michener, 2000)

En el presente trabajo se utilizará la clasificación según Moure (1946)

1.2.2 Biología y Ecología

Tetragonisca angustula (Latreille, 1811), es conocida coloquialmente en Colombia como “abeja angelita”, “virginita”, “virgencita” o “rubita” y es una de las especies ampliamente distribuidas en el continente (Nates-Parra, 2001a).

Se encuentra incluida en la subfamilia Meliponinae con amplia distribución en Colombia. Como las otras meliponinas, estas abejas fundan las colonias perennes a partir de enjambres con una reina, trabajadoras y ocasionalmente machos, y en ellas establecen su cría y la producción de miel (Roubik, 2006). El proceso de establecimiento de la colonia comienza con la búsqueda de una nueva ubicación por parte de las abejas exploradoras, la limpieza del nuevo nido y la construcción de la entrada, el traslado de algunos recursos

desde la antigua colonia y finalmente la llegada de la reina virgen con trabajadoras antes de copular (Van Veen & Sommeijer, 2000). Al igual que *A. mellifera*, las meliponinas son altamente eusociables. También se caracterizan porque tienen una única cópula, preservan la conexión con el nido madre, no usan cera pura para la construcción del nido, los machos utilizan diferentes fuentes de alimentación, y las hembras grávidas no pueden volar (Roubik, 2006).

Tiene un marcado sistema de castas y su ciclo de vida, que cuenta con huevo, larva, pupa y adulto, varía entre 33 a 40 días aproximadamente. Inicia con la postura de un huevo por cada celda previamente cargada de alimento que será operculada y cuidada por obreras hasta la emergencia del imago (Nates-Parra & Lopera, 1989; Roubik, 2006). La fase de huevo dura aproximadamente 6 días, la larva (3 instar) alrededor de 10 días, la prepupa tres días y la pupa entre 14.5 y 21.5 días (Nates-Parra & Lopera, 1989).

Van Veen y Sommeijer (2000) observaron en colonias de *T. angustula* en Costa Rica que la búsqueda y preparación de los nuevos nidos tarda aproximadamente de 2 a 13 días antes de la llegada de la nueva reina con el enjambre, manteniendo una distancia al nido madre de entre 2,10 y 5 m con el que comparte lazos durante aproximadamente 36 días, aunque el tiempo de la relación puede durar mucho más. Así mismo, estos autores indican un rápido desarrollo de la descendencia. En otros estudios se reportan distancias de establecimiento del nido más amplias con respecto al nido madre (Inoue et al., 1984; Nogueira-Neto, 1954; Terada., 1972)

Se ha encontrado que *T. angustula* es una especie generalista que visita muchos tipos de flores para la obtención de polen, en especial de solanáceas (Nates-Parra, 2009; Vit & Pedro, 2013, Chapter 23). Su producción de miel oscila entre los 500 ml y 1L (Rosso-Londoño & Nates-Parra, 2005), volumen significativamente menor al producido por *A. mellifera*, con características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas diferentes y propiedades antimicrobianas destacadas (Gamboa & Figueroa, 2009; Miorin et al., 2003; Olaya et al., 2014).

Es una especie de amplia distribución desde el sur de México hasta el sur de Brasil (Camargo & Pedro 2008). De acuerdo con el estudio realizado en Medellín, Colombia por Vélez *et al.* (2013), esta especie posee características que le permiten establecerse bien tanto en ambientes naturales como en urbanos. Puede ser encontrada entre los 0 y 2000 m.s.n.m., principalmente en el rango de 500 a 1500 m.s.n.m., con una alta capacidad de

adaptación a las zonas urbanas pues ocupan cavidades y recipientes que son fáciles de encontrar en todo tipo de ciudad (Nates-Parra, 2001a, 2005; Nates-Parra et al., 2006; Velez-Ruiz et al., 2013). En la naturaleza, prefieren hacer sus nidos en cavidades de árboles vivos, utilizando nidos de aves que cuelguen de las ramas o de manera subterránea (Baquero & Stamatti, 2007).

Rasmussen y Cameron (2007) encontraron que *Trigona* s.l. no es un grupo monofilético sino que se separa en clado neotropical y el clado Indomalayo/Australasiano. El clado neotropical que incluye a *T. angustula*, si es monofilético, siendo grupo hermano de *Nannotrigona melanocera* (Rasmussen & Cameron, 2007) y de los clados *Melipona* y *Plebeia* (Arias et al., 2006).

Se considera que *T. angustula* incluye dos subespecies reconocidas morfológicamente diferentes, que corresponden a *T. angustula angustula* (Latreille) con mesoepisterno de color negro y *T. angustula fiebrigi* (Schwarz) con mesoepisterno de color amarillo. Estas pueden hibridizarse generando descendencia con variación en los patrones de coloración característico de las sub especies en el mesepisternón (Barroso & Betioli, 2005), de la misma manera que hibridizan otras especies de meliponinos (Nates-Parra & Roubik, 1990). La distribución de *T. a. angustula* corresponde a lo descrito para la especie, mientras que *T. a. fiebrigi* se encuentra restringida a algunas áreas de Brasil.

Para confirmar la hipótesis de la existencia de dos subespecies dentro de *T. angustula*, se ha hecho necesario del apoyo en estudios moleculares.

Inicialmente no se conocían marcadores genéticos para *T. angustula*, pero Castanheira y Contel (1995) encontraron en el metabolismo de carbohidratos, marcadores correspondientes a la producción de hexoquinasa con polimorfismo postraduccional que origina diferentes versiones de la enzima. Dichas variaciones no fueron consideradas como suficiente evidencia como determinantes en la separación de diferentes especies, dado que fueron encontrados híbridos dentro de la misma colonia.

Vicente et al. (2006) utilizando DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD en inglés) encontraron dos poblaciones de *T. angustula* en Brasil con un amplio grado de polimorfismo que indica que son geográfica y genéticamente diferentes, además de altos grado de heterogeneidad. A pesar de esto, en este estudio no fue posible separar por este medio las subespecies *T. a. angustula* de *T. a. fiebrigi*. Caso contrario al estudio de Oliveira

et al. (2004), en el que, utilizando el mismo método RAPD, las colonias colectadas en Brasil se separaron en dos grupos con evidencia de progresiva diferenciación genética debido a la separación geográfica y las condiciones ambientales de cada sitio, además de la capacidad de hibridización de las dos sub especies.

1.3 Microorganismos asociados a insectos

La relación simbiótica entre microorganismos y los seres vivos, se ve reflejada en la historia evolutiva que se ha trazado por la interacción directa entre ellos, aportando nuevas características primarias o secundarias al hospedero o mejorando la salud del mismo (Douglas, 2009, 2010, 2014). La microbiota, que incluye la totalidad de los microorganismos que se encuentran dentro o sobre el hospedero, tienen la capacidad de modificar su comportamiento de manera neutral, positiva como relación comensalista o negativa como relación antagonista o amensalista (Lewis & Lizé, 2015), y de la competencia microbiana, el organismo hospedero puede sacar beneficios (Coyte et al., 2015)

En insectos, se conoce la presencia de microorganismos simbioses del exoesqueleto que proporcionan la coloración en algunos grupos (Sloan & Moran, 2013), en glándulas salivales que permiten la inhibición de hongos (Cardoza et al., 2006), en células especializadas llamadas bacteriocitos que incluso pueden influir en la longevidad, fecundidad, el desarrollo y hasta el peso del individuo (Baumann, 2005; Feldhaar & Gross, 2009; Zheng et al., 2017) o incluso bacterias intracelulares que se distribuyen por diferentes tejidos del insecto, asegurando su transferencia vertical al unirse al genoma de su hospedero. Tal es el caso de la bacteria *Wolbachia* sp., la cual se encuentra naturalmente en diferentes insectos y que pasa de generación tras generación por transferencia vertical, mientras que tiene efectos fisiológicos y reproductivos en su hospedero (Werren et al., 2008)

Desde el huevo hasta el imago, la presencia de microorganismos en todas las fases es determinante. Los huevos de los insectos se caracterizan por tener capas de bacterias sobre ellos, las larvas ingieren microorganismos que las rodean y que se encuentren en el alimento que tienen a su disposición, y desarrollan la flora particular para su estadio (Kaya & Vega, 2012, Chapter 8). Así mismo, se conoce que en insectos sociales principalmente, se da la transferencia entre generaciones de los microorganismos benéficos que confieren

funciones de nutrición o protección (Engel & Moran, 2013; Koch & Schmid-Hempel, 2011b; Martinson et al., 2011; Powell et al., 2014). Díaz et al. (2016) demostraron esto al describir la comunidad microbiana en *Melipona quadrifasciata* (Apíde, Meliponini) sugiriendo una posible influencia de la microbiota asociada a la colonia sobre el estado de salud de la misma.

La presencia de microorganismos en el tracto digestivo de los insectos como simbioses facultativos ha facilitado la digestión de los alimentos, enriqueciendo de esta manera la nutrición del hospedero, evitando en muchos casos intoxicación causada por el alimento que ingieren (Adams et al., 2013; Baumann, 2005; Douglas, 1998, 2014; Warnecke et al., 2007), mejorando la defensa contra patógenos y parásitos (Dillon et al., 2005; Koch & Schmid-Hempel, 2011b; Yoshiyama & Kimura, 2009) y confiriendo resistencia a insecticidas (Kikuchi et al., 2012; Werren, 2012).

La composición de las comunidades microbianas presentes en los intestinos no solo depende de las características físicas, químicas, estructurales y fisiológicas de cada tracto, sino también de los ecosistemas, el genotipo del hospedero y la dieta (Hroncova et al., 2015; Huang & Zhang, 2013; Jones, Fruciano, Hildebrand, et al., 2018; Mohr & Tebbe, 2006; Prado et al., 2010; Tsuchida et al., 2002; Zouache et al., 2011), así como de la presencia de parásitos como la varroa (Marche et al., 2019). La comunidad bacteriana se divide en la microbiota basal, ecológicamente distintiva que posiblemente ha coevolucionado con el hospedero como simbioses, y la microbiota adquirida en el medio ambiente (Koch et al., 2013; Martinson et al., 2011).

En su mayoría, los trabajos de microbiota en insectos han aumentado, siendo de gran interés los microorganismos asociados a polinizadores como las abejas. Principalmente las investigaciones han estado dirigidas hacia los microorganismos asociados a los productos, castas y etapas evolutivas de las abejas melíferas, así como a los microorganismos correspondientes a los intestinos de melíferas y abejorros.

Por ejemplo, Jones et al. (2018) encontraron una relación entre los microorganismos de los intestinos de *A. mellifera* y los encontrados en las plantas donde ellas forrajean, Kapheim et al. (2015) observaron variación entre los microorganismos presentes en individuos de diferentes castas y observaron la relación que existe entre las labores de las abejas y la distribución de los microorganismos en la colonia, especialmente las forrajeras

que traen del exterior los microorganismos y las nodrizas que, al trabajar con el polen llevan los microorganismos a otros sitios y Acosta-Saraiva et al. (2015) encontraron similitud en los phyla asociados al pan de abejas y las abejas africanizadas, pero grandes diferencias en cuanto a las especies asociadas con cada una de ellas. Así mismo se reportan para abejas sin aguijón las levaduras *Zygosaccharomyces machadoi* sp. nov., *Starmerella meliponinorum* sp. nov., *Starmerella bombicola*, levaduras del complejo *Candida apicola* entre otras (Rosa et al., 2003; Rosa & Lachance, 2005; Teixeira et al., 2003) y para *Bombus* y *A. mellifera*, 42 cepas de *Gilliamella apicola* capaces de metabolizar azúcares tóxicos (Zheng et al., 2016). Recientemente se identificó a *Bombella apis* como un microorganismo con propiedades antifúngicas que podrían estar protegiendo a *A. mellifera* de patógenos como *Beauveria bassiana* y *Aspergillus flavus*, gracias a los metabolitos secundarios que dicha bacteria produce (Miller et al., 2020).

El uso de herramientas moleculares también ha permitido avanzar ampliamente en la definición de interacciones, filogenias y relaciones de microorganismos con los insectos. En muchos estudios la secuencia del gen 16S rRNA es ampliamente utilizada, por ejemplo, para estudiar la variación de dos especies de bacterias dentro de los intestinos de *A. mellifera* (Engel et al., 2014), para estudiar la diversidad, la composición, la especificidad del hospedero y el modo de transmisión de *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apicola* en abejas corbiculadas (Koch et al., 2013; Ludvigsen et al., 2015, 2018), como herramienta que facilita la identificación de bacterias (Lamei et al., 2017) o incluso para estudiar las filogenias de los microorganismos, como *Bacillus* (Nakamura, 2000). Otros usos de las herramientas moleculares incluyen el aporte de información para la construcción de librerías de RNA para identificar virus potencialmente patógenos en Himenóptera y ácaros (Brown et al., 2019) o el uso de genómica, transcriptómica y metatranscriptómica para determinar el hologenoma de un organismo (Moran & Sloan, 2015).

Múltiples estudios han encontrado un grupo particular de microorganismos compartidos consistentemente por los tractos digestivos de algunas especies de los géneros *Apis*, *Bombus* y *Osmia* conocido en inglés como “core microbiota”. Está compuesta principalmente por los grupos Alfarproteobacterias, Betaproteobacterias, Gamaproteobacterias, Firmicutes y Bacterioides, con alta presencia de microorganismos aeróbicos (Koch & Schmid-Hempel, 2011a; Martinson et al., 2011). Este grupo tiende a permanecer estable en los intestinos de abejas sociales, a diferencia de otros microorganismos, cuya abundancia y diversidad se ve afectada por el ecosistema en el

que los individuos forrajeen, o la presencia de parásitos que tienen la capacidad de activar tanto el sistema inmune del hospedero, como un aumento de la diversidad microbiana en los intestinos (Koch et al., 2012). Otros estudios asocian cada parte del intestino con dichos grupos bacterianos (Martinson et al., 2012), los cambios de la microbiota en diferentes estaciones climáticas (Corby-Harris, Maes, et al., 2014; Kešnerová et al., 2019) o las funciones que estos microorganismos cumplen en el intestino (Kešnerová et al., 2017) entre otros.

También se sabe que, aunque hay géneros que se pueden encontrar en estados inmaduros al comparar con abejas adultas como por ejemplo algunos filotipos de *Serratia*, y otros exclusivamente en larvas como *Delftia tsuruhatensis*, hay otras bacterias encontrados principalmente en adultos como algunos filotipos de *Lactobacillus*. Este género tolera medios ácidos y procesa azúcares, por lo que se espera encontrarlo en el néctar y el polen que se asocia con el alimento de adultas y no de larvas (Mohr & Tebbe, 2006; Olofsson & Vásquez, 2008). Una de las propiedades que se conocen de las bacterias ácido lácticas es su participación en la producción de miel y la fermentación del polen para la fabricación del pan de abeja en colonias de *A. mellifera* (Acosta-Saraiva et al., 2015; Vásquez & Olofsson, 2009), y autores como Vásquez et al. (2012) y Endo y Salminen (2013) sugieren que, siendo *Lactobacillus* conocido por inhibir patógenos y conservar los alimentos, así mismo podrían estar teniendo una importante función en el mantenimiento de la salud y nutrición de especies de abejas con y sin aguijón, donde su presencia es elevada.

Estudios realizados con *T. angustula* (Vallejo, 2020) y *A. mellifera* (Gilliam, 1997; Jones et al., 2018; Martinson et al., 2011) mostraron que las abejas recién emergidas poseen un menor número de microorganismos que van reforzando con el pasar del tiempo y al estar en contacto con las obreras, las abejas juveniles de las colonias muestreadas adquieren progresivamente los microorganismos asociados a la colonia.

Lamentablemente en la actualidad, las especies de abejas no sólo comparten microorganismos benéficos dentro de la misma colonia o entre especies. La transmisión horizontal de patógenos es uno de los mayores problemas para la salud de las abejas causando el declive de las poblaciones (Fürst et al., 2014; Graystock et al., 2015; Levitt et al., 2013; McMahon et al., 2015; R. Singh et al., 2010) y esto se ve acentuado por el tránsito de especies invasoras y el desplazamiento accidental o deliberado de especies.

1.4 Patógenos de abejas, disbiosis y transporte de colonias.

En *A. mellifera*, varias especies de *Bombus* sp. y algunos meliponinos, gran variedad de patógenos y parásitos han sido descritos, tales como virus, hongos, protistas y otros insectos (Evans & Schwarz, 2011; Nunes-Silva et al., 2016) que, aunque no en todos los casos representan un peligro para los insectos al presentarse de manera asintomática (Genersch, 2010), pueden llevar a la pérdida de algunos individuos e incluso la muerte de colonias completas. Estos pueden ser compartidos entre diferentes especies, potencialmente debido a que las flores forrajeadas sirven como intermediario para la transmisión (Mcart et al., 2014).

Algunos ejemplos de parásitos encontrados en abejas son los tripanosomatidos *Crithidia mellificae* y *Lotmaria passim* que han sido detectados en colonias de melíferas africanizadas, siendo *L. passim* probablemente relacionado con la presencia de *Varroa destructor* (Castelli et al., 2019) o *Nosema ceranae*, un microsporidio aparentemente relacionado con el desbalance microbiológico en el intestino de las abejas mellíferas y meliponinas (Li et al., 2017; Porrini et al., 2017; Purkiss & Lach, 2019). Las abejas también sufren por la presencia de ácaros pertenecientes al complejo *Varroa* (Anderson & Trueman, 2000; Ritter, 1981) o *Pyemotes tritici* en colonias de abejas sin aguijón (Menezes et al., 2009), por el fórido *Apocephalus borealis* que reduce su tiempo de vida (Core et al., 2012; Otterstatter et al., 2002), *Aethina tumida*, coleóptero que se ha encontrado en colonias de *Apis*, en nidos de *Bombus* (Hoffmann et al., 2008) y *Melipona* (Lóriga et al., 2014) y las polillas *Achroia grisella* y *Galleria mellonella* (Spangler, 1988).

Por otro lado se han encontrado microorganismos como *Ascosphaera apis*, un hongo detectado en polen, que ataca las larvas de abejas causando lo que se conoce como cría yesificada (Pereira et al., 2019) así como gran variedad de virus como el de alas deformes, de la celda real negra, virus de la parálisis aguda israelí, virus de la parálisis aguda, virus de la parálisis crónica, virus de abejas kashmir y el virus de la cría ensacada, todos encontrados no solo en obreras y reinas de *A. mellifera* (Chen et al., 2005; Landaverde González et al., 2010; Tentcheva et al., 2004) sino también en abejas sin aguijón (Guzman-Novoa et al., 2015) y *Bombus* (McMenamin & Flenniken, 2018).

En cuanto a bacterias patógenas, se conocen los efectos de *Paenibacillus larvae* o *Melissococcus plutonius*, conocidas por generar las enfermedades conocida como loque americana y loque europea, que llevan a la muerte de la colonia (Forsgren, 2010; Heyndrickx et al., 1996). *Lysinibacillus sphaericus* (Firmicutes, Bacillaceae), es una bacteria recientemente aislada de *Tetragonula carbonaria* y *Austroplebeia australis*, y es la causante de la muerte de sus colonias en Australia (Shanks et al., 2017).

Sin embargo, la presencia de agentes externos a la colonia no es el único causante de problemas en la salud de las abejas. La presencia de microorganismos asociados específicamente a los intestinos de vertebrados e invertebrados han generado una gran curiosidad en cuanto a su composición, pero también a su papel respecto a su hospedero (Mcfall-ngai et al., 2013). Hasta el momento se ha encontrado que organismos con sus microorganismos simbiotes balanceados gozan de buena salud (Hamdi et al., 2011), no solo demostrado en humanos y otros vertebrados, sino también en insectos como las abejas, las cuales han servido como modelo para la investigación en este campo (Kwong & Moran, 2015). Gracias a ellas se conoce que la presencia de microorganismos activa la producción de péptidos antimicrobianos encargados de la homeóstasis o equilibrio manteniendo las proporciones bacterianas en el intestino y a su vez inhibiendo el crecimiento de bacterias u otros microorganismos externos que normalmente no estarían ampliamente representadas generando problemas en la salud del individuo (Kwong et al., 2017).

Cuando algún factor externo rompe el equilibrio microbiano dentro del hospedero, causando la desproporción relativa de las especies dentro de la microbiota nativa, se le conoce como disbiosis. Este fenómeno tiene un gran impacto en la salud del hospedero, por ejemplo al verse reducida la capacidad de procesamiento del alimento, impactando directamente la nutrición de los individuos (Dolezal & Toth, 2018; Douglas, 2009, 2015), aumentando la vulnerabilidad frente a patógenos como los hongos (Miller et al., 2020) o afectando el mecanismo de estímulo del sistema inmune que es realizado por las bacterias asociadas al hospedero (Kwong et al., 2017). En otros organismos, el estrés, los antibióticos, los químicos las estaciones y la dieta también influyen en el cambio de los simbiotes asociados al hospedero (Kešnerová et al., 2019; Raymann & Moran, 2018).

En las abejas se conoce que los insecticidas como el glifosato o el clorotalonil pueden modificar la microbiota asociada a los intestinos cuando las colonias están expuestas a

aplicaciones constantes (Hamdi et al., 2011; Kakumanu et al., 2016) y los neonicotenoïdes causan cambios en el comportamiento de las nodrizas retrasando sus actividades como cuidadoras de las larvas y las celdas de cría, lo que puede llevar a condiciones óptimas para que los patógenos se alojen en las celdas y que el desarrollo de las crías se afecte (Siefert et al., 2020) Por otro lado si las forrajeras tienen dificultades en la recolección de recursos, las abejas adultas ven comprometida su nutrición al tener que consumir polen almacenado que modifica la microbiota intestinal y puede causar su muerte (Maes et al., 2016). Esta problemática se presenta por ejemplo cuando hay impactos en el paisaje debido a actividades antropogénicas que modifican o reducen la disponibilidad floral (Naranjo et al., 2009) ya que las abejas se ven forzadas a aprender nuevamente qué recursos florales se encuentran disponibles y a decidir cuáles de ellos son suficientemente buenos para su nutrición (Amaya Márquez, 2009).

No se tiene claridad si la disbiosis puede estar también relacionada con el traslado de colonias de abejas melíponas y melíferas entre regiones, pero existen riesgos asociados al movimiento de colonias que deben tenerse en consideración:

Primero, a pesar de que el uso de abejas nativas o mieleras reduce la necesidad de importación de abejorros no nativos que pueden ser portadores de enfermedades exóticas (Smith-Ramírez et al., 2018), las colonias transportadas pueden ser portadoras de sus propios patógenos, que pueden ser igualmente transmitidos a las abejas locales.

Segundo: El impacto energético ocasionado a las colonias es alto pues se ven forzadas a tener que reconocer la nueva zona en búsqueda de fuentes de alimento (Amaya Márquez, 2009),

Tercero, se ha demostrado que el transporte de abejas puede causar la afectación de las glándulas de alimento (glándulas hipofaríngeas) las cuales están directamente relacionadas con la calidad de alimento que reciben las larvas de futuras obreras (Ahn et al., 2012). Esto conlleva a que las larvas reciban alimento de menor calidad o en menor cantidad, causando efectos sobre su fisiología y su comportamiento como adultas (Scofield & Mattila, 2015).

Cuarto, el transporte y la exposición de las colonias trasladadas a nuevas condiciones ecosistémicas, nuevos patógenos y a áreas con influencia de insecticidas puede causar estrés a las abejas, que pueden llevar a la disminución de la esperanza de vida y la afectación en el metabolismo del oxígeno (Chakrabarti et al., 2015; Simone-Finstrom et al., 2016)

2. Materiales y Métodos

2.1 Deterioro de las colonias de *Tetragonisca angustula*

Colmenas de *Tetragonisca angustula* presuntamente provenientes de Medellín y Betania (Antioquia), al igual que colonias locales fueron transportadas a meliponarios de la Hacienda Agroecológica El Paraíso. A partir de 2013 fueron establecidas 70 colonias, las cuales están contempladas en el Proyecto de Abejas Nativas, Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de la ciudad de Medellín gracias al Convenio marco para fortalecer el conocimiento, uso y manejo de las abejas nativas de Colombia.

Desde mitad de 2014, colonias de *T. angustula* establecidas en colmenas en la Reserva El Paraíso presentaron deterioro y reducción progresiva de la población de abejas adultas, avanzando por diferentes etapas de deterioro hasta llegar a la muerte de la colonia. La observación de colonias con reina, pero sin posturas nuevas, suciedad del cerumen, involucro reseco, abandono de reservas de miel, cadáveres dentro del panal y presencia de otros artrópodos colonizadores, pusieron en alerta a la reserva. Colonias en situación similar se observaron en el Jardín Botánico de Medellín, y se conocieron testimonios de meliponicultores en la Costa Atlántica que describieron una situación similar en colonias llevadas de otras regiones.

En la visita de campo al municipio de Santa Bárbara (Antioquia), también se conoció la descripción de un episodio de muerte masiva de colonias de abejas sin aguijón de la especie *T. angustula*, que hacían parte de un proyecto productivo. La descripción del deterioro de las colonias presentaba elementos comunes con los eventos de deterioro observados en Cimitarra. Estas abejas también habrían sido transportadas desde otras regiones para el establecimiento de un nuevo meliponario, pero progresivamente fueron muriendo sin una explicación clara. En la actualidad, solo una de las colonias sobrevive.

Según Rosso-Londoño (en prep.), existen elementos comunes en las señales de deterioro de las colonias que, aunque no se presenten todas o en el mismo orden, se clasifican de la siguiente manera:

Etapa temprana:

- Discos de cría de colonias aparentemente sanas, presentan una superficie “irregular”
- Discos de cría recientes con gruesas capas de cerumen (engrosados) y celdas aparentemente recién construidas con una forma atípica
- Discos de cría con pocas celdas fallidas (vacías) y a veces con el cerumen de la base del disco sin limpiar.

Etapa tardía:

- Interrupción de postura por parte de la reina
- Discos de cría con muchas celdas fallidas, algunas con restos de alimento larval en el fondo.
- En ocasiones todo el disco de cría sin celdas, pero con el piso o fondo sin ser removido
- Celdas de cría irregulares (con forma y agrupamiento atípicos) y algunas aparentemente de mayor tamaño; celdas aisladas.
- Discos de cría sin limpiar, con larvas o pupas muertas y sin remover (en ocasiones algunas ya necrosadas).
- En ocasiones abejas adultas muertas y sin remover.
- Disminución gradual de la población y cese total de postura, a pesar de haberse encontrado reinas fisiogástricas vivas dentro de colonias sin cría y con muy pocas o ninguna abeja obrera.
- Muerte de la colonia.

Las estrategias que hasta 2015 se utilizaron para buscar las causas de la sintomatología, han incluido la suspensión de la alimentación con cápsulas de polen, la movilización de las colmenas a zonas con mejores características de luminosidad y aireación o el traslado a un hábitat diferente, adición de discos de cría, en ocasiones con celda real, o intercambio

de sitio con colonias fuertes para captar obreras adultas sin encontrar cambios positivos en las señales de deterioro. Dado que el uso de agroquímicos en la Hacienda está totalmente prohibido por ser una reserva agroforestal, desde el principio fue rechazada la hipótesis de que dicha alteración de colonias sea efecto de insecticidas, conocidos por sus múltiples efectos sobre las abejas y su microbiota asociada (Crall et al., 2018; Goulson et al., 2015; Hamdi et al., 2011; Hladik et al., 2016; Jacob et al., 2019; Motta et al., 2018; Raymann et al., 2018; Rundlöf et al., 2015; Sánchez-Bayo et al., 2016; vanEngelsdorp et al., 2009; Xavier et al., 2010).

Si bien se han tomado muestras para verificar los causantes de enfermedades más comunes en abejas como bacterias patógenas y los cuatro principales virus (Virus de Alas Deformes, Virus de la Cría Ensacada, Virus de la Parálisis Aguda, Virus de la Celda real Negra), todas las pruebas realizadas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá han resultado negativas.

Debido a estos resultados, se han propuesto otras posibles causas de los cambios en las colonias de estudio, entre las que se cuenta la presencia de un microorganismo no reportado para *T. angustula*, como reportan Ravoet *et al.* (2013) para *A. mellifera*, la transferencia de patógenos de *A. mellifera* a polinizadores nativos (Fürst et al., 2014) o la probabilidad de un desbalance en la microbiota natural como los encontrados para *Bombus atratus* (Gamboa et al., 2015), ya que se conoce ampliamente la función de los microorganismos en la salud de las abejas (Alberoni et al., 2016; Bonilla-Rosso & Engel, 2018; Kapheim et al., 2015; Menezes et al., 2013; Raymann & Moran, 2018; Zheng et al., 2017)

2.2 Área de estudio

Las colectas se realizaron en el municipio de Cimitarra-Santander en la Hacienda Agroecológica el Paraíso (HEP) y el municipio de Santa Bárbara Antioquia.

2.2.1 Hacienda Agroecológica el Paraíso (HEP)

Ubicada en Cimitarra, Santander (Figura 5) aproximadamente a 22km de Puerto Berrío, Antioquia (Figura 6), a la HEP cuenta con 240 hectáreas de terreno privado, denominados como reserva natural de la sociedad civil.



Figura 5. Ubicación geográfica Hacienda el Paraíso

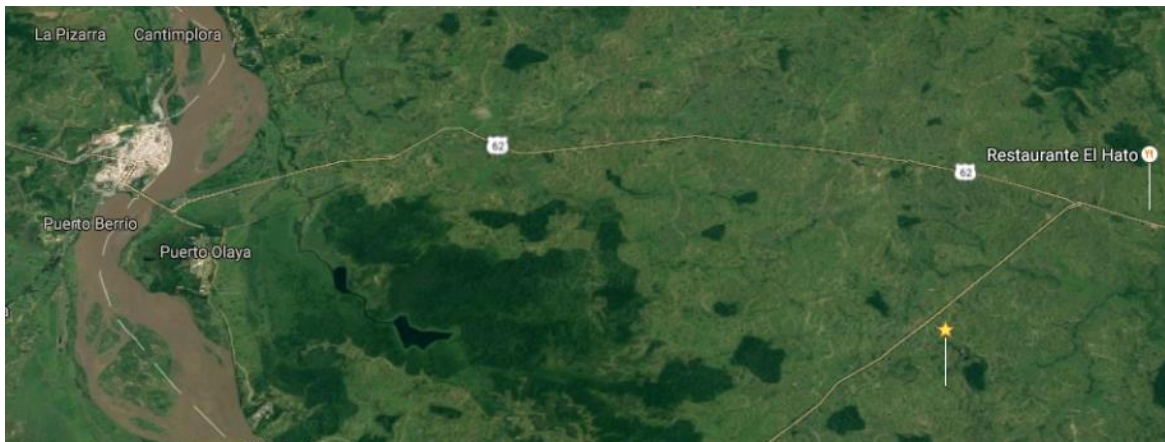


Figura 6: Ubicación específica HEP en google maps

48% del terreno está conformado por cuerpos de agua, 14 hectáreas de bosque en proceso sucesional y de reforestación, zonas de conservación, amortiguación y manejo especial, mientras que el 52% restante reúne sistemas agrosilvopastoriles e infraestructura (Figura 7). Gracias al interés de los propietarios del terreno, desde hace 10 años se ha trabajado para la reconversión de los sistemas productivos de ganadería convencional hacia sistemas sostenibles de producción como el silvopastoreo, la estabulación de ganado vacuno y bufalino, además de la producción de abonos orgánicos. Tiene como objetivos de conservación la preservación de las franjas de bosque, el hábitat de fauna y flora nativas

y la protección de fuentes hídricas, lo que la hace un enclave de conservación en un contexto territorial con ecosistemas altamente perturbados.



Figura 7: Terrenos HEP

Cimitarra se encuentra en el suroccidente del departamento de Santander, a una altura de 200 m.s.n.m. y temperatura promedio de 32°C.

Las colonias seleccionadas para los muestreos fueron tanto las provenientes de Betania y Medellín, como las naturalmente establecidas en los meliponarios de la hacienda. Así mismo se tuvo en cuenta el muestreo del estado de cada colonia, observando las características de avance de las señales de deterioro.

2.2.2 Municipio de Santa Bárbara

Ubicado en el suroeste antioqueño a 53 km de Medellín (Figura 8), la cabecera municipal se encuentra a 1800 m.s.n.m., aunque algunas de sus 42 veredas alcanzan altitudes menores. La temperatura promedio es de 19°C y se distingue por la producción de miel de

Apis mellifera de alta calidad. En la actualidad, los apicultores han mostrado interés en trabajar con meliponinos para diversificar los productos que en esta región se pueden encontrar.



Figura 8: Ubicación del municipio Santa Bárbara en Antioquia.

Dado que únicamente se pudo encontrar una de las colonias asociadas al episodio de mortalidad de las abejas, se realizaron muestreos de colonias aparentemente sanas, y todas originarias del municipio de Santa Bárbara.

2.3 Toma de muestra en campo.

En la HEP se muestrearon 8 colonias, de las cuales 6 son nativas de la región y 2 pertenecientes al lote trasladado desde Medellín, aunque su localidad de procedencia es incierta. Estas últimas son las únicas que forman parte del grupo de 70 colonias compradas al Jardín Botánico de Medellín en 2014. En Santa Bárbara se muestrearon 6 colonias almacenadas en guaduas, cajas de cartón y cajas de madera con alzas, distribuidas en diferentes puntos del municipio. Corresponden a nidos silvestres que se establecieron en los diferentes contenedores o que fueron extraídos de su lugar de nidificación original y trasladados a las cajas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Para determinar el tamaño de la muestra se tuvo en cuenta la técnica de muestreo no probabilístico por conveniencia, dado las características descriptivas del presente estudio.

De cada colonia muestreada se tomaron sistemáticamente con instrumentos previamente desinfectados con alcohol al 90% muestras de:

- 1) Piquera (PI): Tubo de entrada a la colmena.
- 2) 10 a 12 abejas pecoreadoras (AP): Abejas encargadas de la colección del polen. Fueron capturadas en vuelo antes de ingresar por la piquera.
- 3) 10 a 12 abejas adultas (AA): Si bien las abejas pecoreadoras también son abejas adultas, para el presente trabajo se catalogaron y muestrearon como abejas adultas aquellas que se observaron trabajando dentro de la colmena en la construcción de estructuras como involucro o la limpieza.
- 4) 10 a 12 abejas jóvenes (AJ): Se catalogaron como abejas jóvenes aquellas con coloración clara, encargadas del mantenimiento de las celdas de cría.
- 5) Intestino de abeja adulta (IA)
- 6) Intestino de abeja pecoreadora (IP)
- 7) Intestino de abeja juvenil (IJ)
- 8) 6 larvas en cualquier estadio (L)
- 9) 6 pupas (P)
- 10) Tres muestras de pote de miel (PM)
- 11) Tres alícuotas de miel (M)
- 12) Tres muestras de pote de polen (PP)
- 13) Tres muestras de polen (PO)
- 14) Detritos (B)
- 15) Resina (R)
- 16) Involucro (I)
- 17) Disco de cría joven (DJ): Se catalogaron como discos de cría joven aquellos cuyo opérculo se encontrara recientemente construido.
- 18) Disco de cría viejo (DV): Se catalogaron como discos de cría viejo aquellos en los que se observó un desarrollo avanzado de la larva o pupa.

En colonias que presentaran características particulares, se tomaron otras muestras de interés, como en el caso de colonias con presencia de signos de deterioro en las que se tomó muestras de

- 1) celdas fallidas (CF): celdas que nunca fueron operculadas

- 2) Celdas vecinas o adyacentes a las celdas fallidas (CV)
- 3) Celdas no desarrolladas (CND): celdas en las que se observa la existencia de postura, pero en las que no se desarrolló la larva.
- 4) Materia blanca seca (CBS): Materia encontrada dentro de algunas celdas de cría a manera de costra blanca seca.
- 5) Materia blanca húmeda (CBH): Materia encontrada dentro de algunas celdas de cría, blanca y de consistencia suave.
- 6) Larvas adyacentes a las celdas con materia blanca seca (LV)
- 7) Disco de cría joven con engrosamiento sospechoso (DJE): porción del disco de cría joven en el que se observó un engrosamiento atípico del opérculo.
- 8) Celda con opérculo raro (COR): celda de cría en donde el opérculo se observó de superficie irregular, diferenciada de las celdas adyacentes.
- 9) Larva muerta (LM).

Otras muestras tomadas según disponibilidad en las colonias fueron larva real (LR), reina (Re) y cera (Ce).

Para la toma de muestra de PI, AA, AJ, PM, PP, R, I, DJ y DV, se utilizaron pinzas y para L y P, se retiró el opérculo de la celda de cría con ayuda de una aguja de disección (Figura 9) y se extrajo el individuo con ayuda de pinzas planas. B y PO se tomaron con ayuda de una espátula pequeña mientras que las alícuotas de M se tomaron con una pipeta plástica de 1ml. Las AP fueron colectadas en vuelo al regresar al nido, con ayuda de un aspirador manual (Figura 10).



Figura 9: Remoción de opérculo con aguja para extracción de larva y pupa



Figura 10: Aspiración de abejas pecoreadoras

La extracción de los intestinos se realizó bajo estereomicroscopio Nikon SMZ800 con ayuda de pinzas y aguja estéril (Figura 11) y en presencia de mechero para mantener las condiciones de esterilidad.

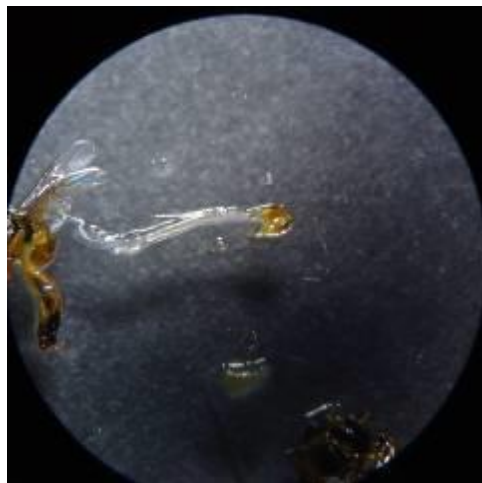


Figura 11: Extracción de intestino de abejas sin aguijón

Todas las muestras fueron almacenadas en tubos de microcentrífuga con un ml de medio de cultivo líquido con glicerol (70%/30%) a -20°C para conservar la viabilidad de los microorganismos en ellas.

2.4 Procesamiento de muestras en laboratorio

Las muestras de abejas, tracto digestivo de abejas y material de la colmena previamente almacenadas fueron trituradas en los tubos de microcentrifuga con maceradores de plástico estériles (Figura 12) y posteriormente se agitaron por 15 minutos a temperatura ambiente para mezclar cada una de las muestras a evaluar e individualizar las células contenidas en cada una de ellas. Luego se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril y se sembraron en superficie en cajas de Petri con agar nutritivo por un período de 24 a 48 horas a 33°C, realizando 2 repeticiones por dilución.

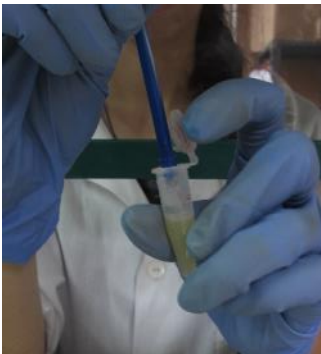


Figura 12: Macerado de muestras en laboratorio

Se observó el crecimiento de las distintas colonias con el fin de determinar las características macroscópicas y clasificar los aislados en los diferentes morfotipos encontrados. Las claves morfológicas fueron dadas por la forma, elevación, borde, consistencia, brillantez y color. Para realizar un estimado de la carga microbiana de las muestras, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de cada uno de los aislados bacterianos. Para obtener el valor final, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = (\text{no. de colonias/volumen inoculado}) * \text{Inverso del factor de dilución}$$

Las colonias individuales se aislaron mediante el método de siembra por agotamiento en Agar nutritivo y posteriormente fueron purificadas. Una vez determinados los morfotipos y verificado la pureza, los aislados fueron criopreservados, utilizando tubos de microcentrifuga con 70% de caldo nutritivo y 30% de glicerol al 99% en un congelador a -20°C (Mendes *et al.*, 2013).

De la totalidad de morfotipos aislados, se seleccionaron todos aquellos que se encontraran presentes en muestras con características particulares del deterioro, como la costra blanca, la celda no desarrollada o la materia viscosa, además de aquellos que fueran muy abundantes y ampliamente distribuidos en todas las fuentes. Cada uno de los aislados fue sembrado nuevamente en agar nutritivo para verificar pureza y fueron enviados a identificar al centro de investigación, innovación y desarrollo científico y tecnológico One Health Consortium del que hace parte la Universidad Nacional de Colombia. Se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar en los aislados las secuencias del gen 16S rARN. Tras amplificar el ADN y obtener las secuencias, estas fueron comparadas con las secuencias almacenadas en genbank utilizando la opción de búsqueda de BLAST avanzada y finalmente se tuvo en cuenta el porcentaje de similitud entre secuencias para definir la especie. Posterior a la identificación se unificaron las abundancias de los morfotipos que correspondían a la misma especie.

Los resultados obtenidos se consignaron en una matriz de datos en Excel y las muestras se almacenaron en la Colección de microorganismos grupo Sustancias activas y Biotecnología - número 228 en el registro nacional de colecciones.

2.5 Análisis de datos

Para el cumplimiento de los objetivos se realizó en el programa estadístico R®, un análisis de escalamiento multidimensional (MDS) por medio del uso de distancias de Camberra, que permite probar estadísticamente la similitud entre las muestras tomando en cuenta no solo la composición por morfotipos en localidades, fuentes y colonias, sino también haciendo uso de las densidades de los morfotipos presentes en las muestras. También se realizó una comparación simple de presencia ausencia por abundancia de las especies en cada una de las fuentes aisladas, análisis de varianza (ANOVA) entre colonias y muestras y se utilizó el índice de Jaccard como medida de similitud en el software PAST 4.03.

3. Resultados y discusión

3.1 Aislamientos e identificaciones

De todas las colonias muestreadas se realizaron 1149 aislamientos de las 18 fuentes sistemáticamente muestreadas (Tabla 1) y 48 aislamientos de las 12 muestras extra (Tabla 2) No sobra recordar que los aislamientos logrados representan únicamente a la porción bacteriana que pudo ser cultivada en agar nutritivo.

Tabla 1 Total de aislamientos y morfotipos por fuente muestreada sistemáticamente en todos los estados de deterioro. (piquera[PI], abeja pecoreadora[AP], abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], larva [L], pupa [P], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], detritos [B], resina [R], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ], disco joven [DJ], disco viejo [DV])

Muestras principales		
Fuente	Número de aislamientos	Número de morfotipos
PI	61	31
AP	90	38
AA	91	38
AJ	70	33
L	55	27
P	68	32
PM	53	26
M	102	46
PP	58	32
PO	79	41
B	94	49
R	35	22
I	47	26
IA	49	26
IP	76	27
IJ	53	29
DJ	35	19
DV	30	19

Tabla 2 Total de aislamientos y morfotipos en muestras extra encontradas en colonias con diferente estado de deterioro (celda vecina [CV], larva vecina [LV], larva muerta [LM], larva real [LR], reina [RE], celda fallida [CF], materia blanca húmeda [CBH], materia blanca seca [CBS], cera [CE], celda no desarrollada [CND], celda con opérculo raro [COR], disco joven engrosado [DJE]).

Fuente	Número de aislamientos	Número de morfotipos
CV	5	5
LV	3	3
LM	2	2
LR	5	5
Re	3	3
CF	2	2
CBH	4	4
CBS	12	10
CE	2	2
CND	6	6
COR	2	2
DJEng	2	2

La Tabla 3 muestra un listado de los morfotipos encontrados con sus características, fotografías e identificaciones disponibles.

Al comparar los aislamientos de todos los estados del deterioro que fueron secuenciados (n=63) en Blast, estas revelan 99% de similitud con 27 especies bacterianas pertenecientes a los grupos Firmicutes (20 especies = 71%), Gammaproteobacteria (6 especies = 21%) y Actinobacterias (2 especies = 7%) (Figura 13). Mohr y Tebbe (2006) realizaron aislamientos de adultos de *B. terrestres*, *A. mellifera* ssp *cárnica* y larvas de *Osmia bicornis*, y encontraron que el mayor porcentaje estaba representado por Firmicutes (23%), algunos Gammaproteobacteria (13%) y 7% Actinobacterias. En ese mismo estudio fueron aisladas Betaproteobacterias (22%), Alphaproteobacterias (13%) y Bacteroides (12%), grupos que, aunque no fueron identificados dentro de las muestras seleccionadas en el presente estudio, no se puede descartar su presencia dentro de la porción no identificada de los morfotipos aislados (77%).

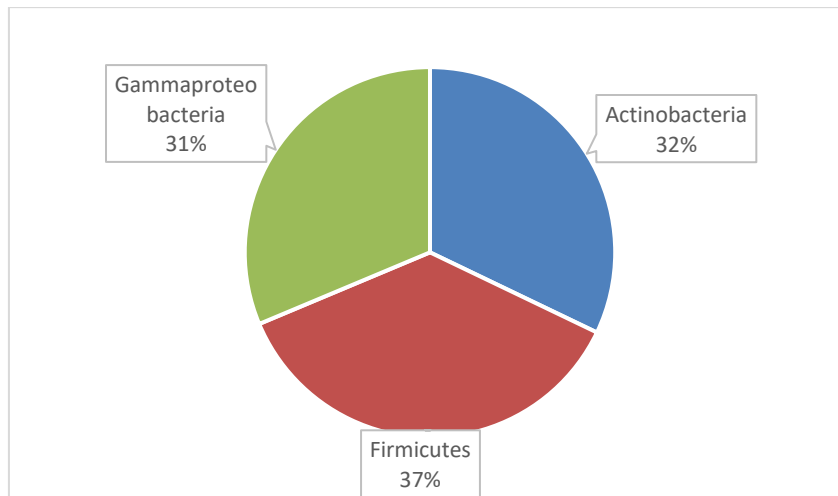




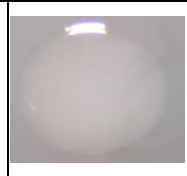

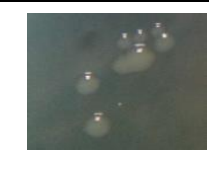

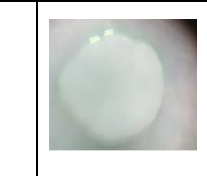



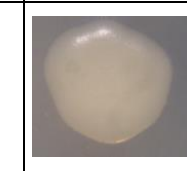

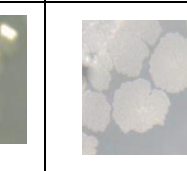




Figura 13 Proporción de grupos bacterianos encontrados en los aislamientos de *T. angustula*.

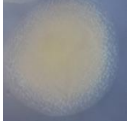

Tabla 3 Descripción fenotípica de los morfotipos bacterianos aislados

Morfotipo	2	7	8	9	10	11	12	13	15
Forma	redonda	redonda	irregular	Redonda	Redonda	redonda	redonda	Redonda	redonda
Borde	Regular	Regular	Irregular	Regular	Regular	regular	regular	regular	irregular
Elevación	convexa	convexa	elevada	Elevada	Elevada	plana	elevada	Convexa	elevada
Superficie	Liso	Liso	Irregular	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso
Color	Amarillo claro	cremosa	Beige	Beige	Beige	incolora	Amarillo pálido	Beige	Blanca
Textura	Cremosa	Blanco	cremosa	cremosa	Cremosa		cremosa	viscosa	cremosa
Fotografía									
ID	<i>Microbacterium paraoxydans</i>		<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Isoptericola variabilis</i>		<i>Bacillus firmus</i>	<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>

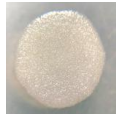



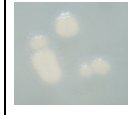
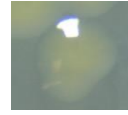


Morfotipo	16	19	23	25	31	32	34	35	39
Forma	redonda	redonda	irregular	redonda	redonda	irregular	redonda	irregular	redonda
Borde	regular	irregular	irregular	regular	regular	irregular	regular	irregular	irregular
Elevación	convexa	convexa	plana	elevada	convexa	plana	convexa	plana	elevada
Superficie	Liso	Liso	irregular	Liso	Irregular	irregular	Liso	irregular	Liso
Color	Amarillo	Amarillo pálido	Blanca con Amarillo oscuro	Blanco	Amarillo claro	beige	Beige	beige	Beige
Textura	Cremosa	cremosa	Cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	seca	cremosa
Fotografía									
ID	<i>Krasilnikoviella flava</i>	<i>Pantoea eucrina</i>		<i>Bacillus altitudinis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus aerophilus</i>		<i>Bacillus pumilus</i>

Morfotipo	40	42	43	44	46	47	48	49	50
Forma	redonda	irregular	redonda	irregular	irregular	redonda	irregular	irregular	redonda
Borde	regular	regular	irregular	irregular	irregular	regular	irregular	irregular	irregular
Elevación	convexa	plana	elevada	plana	plana	convexa	convexa	plana	convexa
Superficie	Liso	Liso	Irregular	irregular	irregular	Liso	Liso	Liso	Irregular
Color	Borde amarillo pálido, centro beige	Borde amarillo pálido, centro blanco	Beige	Beige	Beige	Incolora	Beige	Beige	Beige e incoloro
Textura	viscosa	cremosa	Cremosa	viscosa		cremosa	viscosa	cremosa	Cremosa
Fotografía									

ID *Enterobacter asburiae* *Bacillus plumilus* *Bacillus pumilus* *Enterococcus casseliflavus* *Bacillus Mojavensis* *Bacillus velezensis* *Staphylococcus warneri* *Enterobacter hormaechei*

Morfotipo	51	54	57	59	60	62	64	69	71
Forma	irregular	redonda	redonda	irregular	Irregular	redonda	redonda	redonda	Redonda
Borde	irregular	Irregular	regular	regular	Regular	irregular	regular	regular	Irregular
Elevación	elevada	Convexa	elevada	elevada	Convexa	elevada	elevada	convexa	plana
Superficie	Liso	Irregular	Liso	Liso	Liso	irregular	Liso	Irregular	Irregular
Color	Beige	Blanco	Amarillo claro y oscuro	Beige	Amarillo oscuro e incoloro	Amarillo palido	Beige	Beige	Beige
Textura	cremosa		cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	Cremosa	cremosa	cremosa
Fotografía									

ID *Bacillus velezensis* *Bacillus cereus* *Bacillus Mojavensis* *Bacillus marisflavi* *Acinetobacter baumannii*

Morfotipo	76	79	80	81	82	83	88	92	94
Forma	redonda	irregular	redonda	redonda	irregular	redonda	redonda	redonda	Redonda
Borde	irregular	Irregular	irregular	regular	irregular	regular	regular	regular	Regular
Elevación	elevada	elevada	elevada	convexa	convexa	elevada	convexa	elevada	elevada
Superficie	irregular	Irregular	irregular	Liso	irregular	Liso	Liso	Liso	Liso
Color	Beige	Amarillo oscuro	Amarillo pálido y Beige en centro	Borde Amarillo Pálido, Beige centro	Beige	Beige	Amarillo oscuro	Blanco e incoloro	Amarillo oscuro
Textura	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa	dura	Viscosa	cremosa	cremosa	cremosa
Fotografía									

ID *Lysinibacillus sphaericus* *Staphylococcus saprophyticus* *Bacillus aryabhatai* *Shigella sonnei* *Bacillus siamensis* *Bacillus marisflavi* *Bacillus marisflavi*

Morfotipo	95	96	97	105	106	110	111	112
Forma	redonda	irregular	redonda	redonda	irregular	redonda	redonda	irregular
Borde	regular	regular	irregular	regular	regular	regular	irregular	irregular
Elevación	convexa	elevada	umbligada	convexa	elevada	convexa	elevada	plana
Superficie	Liso	irregular	irregular	Liso	Liso	Liso	Liso	irregular
Color	Amarillo oscuro y Beige en borde	Blanco	Amarillo pálido	Beige	Blanco centro y Beige en borde	Blanco e incoloro en borde	Beige en centro y borde y anillo Amarillo oscuro	Amarillo pálido
Textura	cremosa	seca	seca	dura	cremosa	Cremosa		Cremosa
Fotografía								

ID *Bacillus sp.* *Staphylococcus saprophyticus* *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus cereus* *Bacillus altitudinis* *Bacillus aryabhatai*

Morfotipos	113	114	115	116	117	121	122	124
Forma	redonda	irregular	irregular	irregular	irregular	redonda	irregular	redonda
Borde	irregular	irregular	irregular	irregular	regular	regular	irregular	irregular
Elevación	convexa	convexa	Convexa	Convexa	plana	elevada	Elevada	plana
Superficie	irregular	grumoso opaco en centro y grumosa brillante en borde	Liso	liso	Irregular	Liso	Liso	Liso
Color	Beige	Beige	Beige	Blanco centro y Beige en borde	Blanco centro y borde Beige	Blanco centro y Beige en borde	Amarillo pálido	Amarillo claro
Textura	Cremosa	Viscosa	cremosa	seca	seca		cremosa	cremosa
Fotografía								

ID *Bacillus siamensis* *Bacillus* sp. *Bacillus amyloliquefaciens* *Stenotrophomona maltophilia* *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus marisflavi*

Morfotipos	125	126
Forma	irregular	irregular
Borde	irregular	regular
Elevación	elevada	elevada
Superficie	irregular	liso
Color	Blanco y amarillo oscuro	Blanco
Textura	cremosa	
Fotografía		

ID *Staphylococcus gallinarum* *Staphylococcus saprophyticus*

Las Gamaproteobacterias están representadas por seis especies identificadas y Firmicutes por 20, en su mayoría *Bacillus*, siendo las especies de este género las más frecuentes (Figura 14).

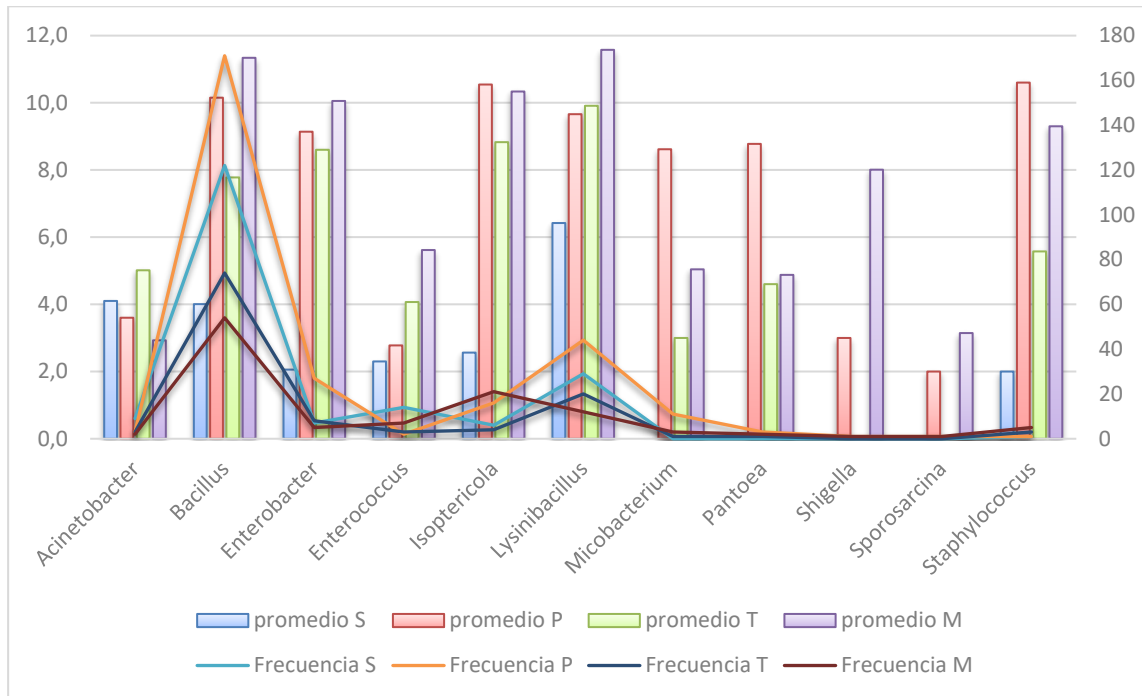


Figura 14 Abundancias y frecuencias de los géneros bacterianos identificados en las diferentes etapas del deterioro. (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía y M: muerte)

3.1.1 Actinobacterias

Las actinobacterias son bacterias Gram positivas conocidas por producir metabolitos secundarios útiles para la producción de antibióticos de uso clínico, antitumorales, anti helmintos, insecticidas y antifúngicos, se pueden encontrar en una gran variedad de fuentes, principalmente el suelo y su crecimiento y producción de metabolitos secundarios se ve influenciado por factores como temperatura, pH y humedad (Barka et al., 2016; Ventura et al., 2006). En insectos, solo se conoce la relación nutricional de las actinobacterias con hemípteros como *Triatoma infestans* (Durvasula et al., 2008) o *Nocardia* (*Rhodococcus*) *rhodnii* (Ben-Yakir, 1987), en cambio se sugiere que pueden actuar como mutualistas encargadas de la salud y defensa de sus hospederos (Kaltenpoth, 2009). Se han aislado actinobacterias de termitas sin saber exactamente su función como

simbionte (Breznak, 1982; König & Varma, 2006; Le Roes-Hill et al., 2011; Watanabe et al., 2003), en los coleópteros *Dendroctonus frontalis* y *Dendroctonus rufipennis* (Coleoptera, Curculionidae) se conoce la participación de las actinobacterias como controlador del hongo competencia del hongo benéfico que cargan para depositar en las galerías como alimento de sus crías (Hoy, 2013; Hulcr et al., 2011) y en himenopteros son ampliamente conocidas como bacterias que proveen protección al hospedero (Matarrita-Carranza et al., 2017), como en el caso de las hormigas cultivadoras de hongo que se aprovechan de los antibióticos producidos por las actinobacterias, para mantener bajo control los parásitos de sus jardines (Barka et al., 2016; Currie et al., 1999; Little et al., 2006).

En el presente estudio, las dos actinobacterias aisladas e identificadas de 15 de las 18 fuentes fueron *Isoptericola variabilis* y *Microbacterium paraoxidans*. A diferencia de Vallejo (2020), quien no encontró Actinobacterias en sus muestreos de intestinos de *T. angustula*, estas dos especies fueron encontradas en muestras de intestinos de juveniles y adultas.

I. variabilis gen. nov., comb. nov. (Stackebrandt, Schumann, & Cui 2004) fue nombrada por primera vez como *Cellulosimicrobium variabilis* (Bakalidou et al., 2002) tras ser aislada de la especie de termitas australianas, *Mastotermes darwinensis*. Tiene capacidad celulolítica y xilanolítica. Fue detectada en las colonias sanas, únicamente en muestras de abejas adultas, pote de polen y miel, mientras que en las otras muestras esta especie se presentó cuantiosamente a partir de la etapa temprana de deterioro (Figura 15).

Por el contrario, *M. paraoxidans* (Laffineur et al., 2003 emend. Buczolits, Schumann, Valens, Rosselló-Mora, & Busse, 2008;) fue menos abundante en los muestreos en comparación con *I. variabilis*, y fue principalmente detectada en la etapa temprana de deterioro (Figura 16). Es una bacteria Gram -positiva de la familia Microbacteriaceae aislada por primera vez de la tilapia del Nilo, conocida principalmente por ser un patógeno de peces (Austin & Austin, 2016). En el ambiente se puede encontrar en muestras de suelo y aguas y se considera promotor de crecimiento de plantas (Grandlic et al., 2008). También fue aislada del intestino de *Spodoptera exigua*, polilla que se alimenta de plantas (Ignasiak & Maxwell, 2017).

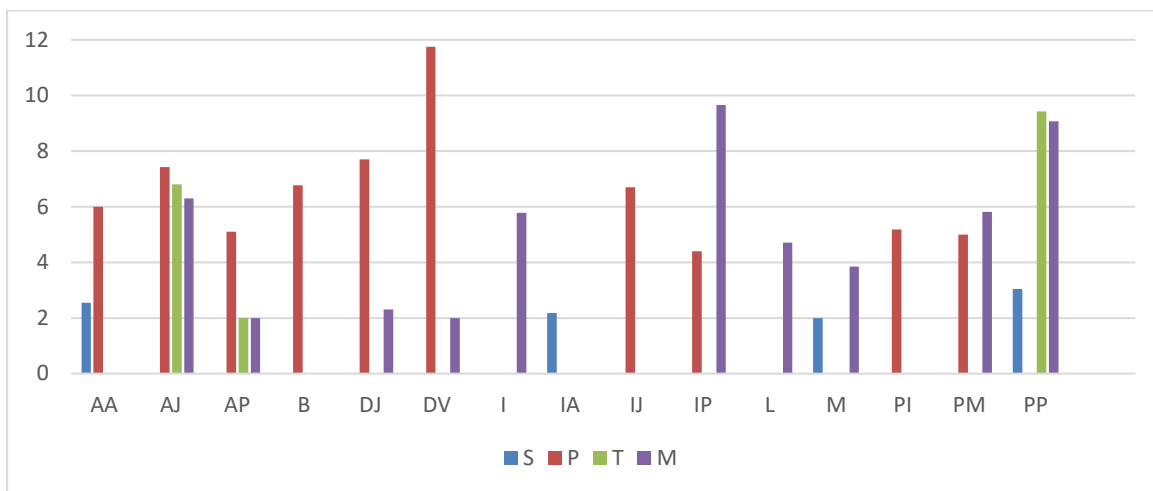


Figura 15 Presencia de *I. variabilis* en las fuentes por cada estado de deterioro. (piquera [PI], abeja pecoreadora [AP], abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], larva [L], pupa [P], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], detritos [B], resina [R], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ], disco joven [DJ], disco viejo [DV] en etapa temprana [P], etapa tardía [T] y muerte [M])

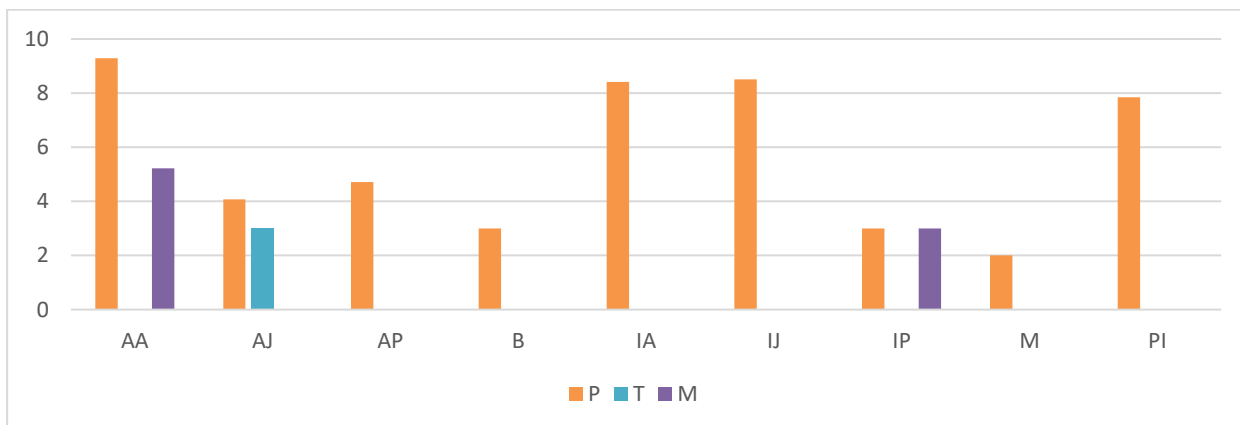


Figura 16 Presencia de *M. paraoxidans* en las fuentes por cada estado de deterioro. (piquera [PI], abeja pecoreadora [AP], abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], detritos [B], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de pecoreadora [IP], intestino de juvenil [IJ] en etapa temprana [P], etapa tardía [T] y muerte [M])

La presencia de actinobacterias en abejas ha sido descrita por varios autores en los últimos 11 años. Promnuan et al. (2009) reportaron 12 especies de *Streptomyces* de colonias del género *Trigona* y Matarrita-Carranza et al. (2017) aislaron 23 cepas de actinobacterias de 34 colonias de abejas que incluían 16 de *T. angustula*. Menegatti et al. (2018) reportaron por primera vez la presencia de una actinobacteria en colonias de *Melipona scutellaris*

(Hymenoptera, Apidae, Meliponini), con capacidad de producir antibióticos activos en contra de *Paenibacillus larvae* (causante de loque americana). Rodríguez-Hernández et al. (2019), de igual manera, aislaron siete cepas de actinobacterias de diferentes abejas de la especie *M. scutellaris*, tres de las cuales mostraron efectos inhibitorios frente a *P. larvae* y a dos hongos, *Beauveria bassania* y *Metarhizum anisopliae*. Kroiss et al. (2010) también encontraron *Streptomyces*, actinobacterias con efectos inhibitorios sobre *P. larvae* en *Trigona laeviceps* y *T. fuscobalteata* y Goettler et al. (2007) encontraron en *Philanthus*, *Trachypus* y *Philanthinus* (Crabronidae), una glándula antenal en donde las abejas cultivan la actinobacteria '*Candidatus Streptomyces philanthi*' para posteriormente secretarla en las celdas de cría para que sea utilizada a manera de defensa por las larvas al construir el pupario. Cambroner-Henrich et al. (2019) lograron aislar seis géneros de actinobacterias de seis fuentes de aislamiento en *T. angustula*, siendo las abejas obreras las portadoras del mayor número de aislamientos.

3.1.2 Firmicutes

Phyla de bacterias en su mayoría Gram positivas y algunas de ellas con capacidad de formar endosporas en caso de condiciones poco adecuadas para su supervivencia. Incluye los órdenes Clostridiales, Lactobacillales y Baciliales, siendo muy abundantes, conocidos y estudiados.

En abejas se han reportado *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Fructobacillus* (*Leuconostoc*), en múltiples estudios que se han enfocado principalmente en la microbiota intestinal, miel y polen (Branco et al., 2006; Crotti et al., 2013; Disayathanoowat, Yoshiyama, et al., 2012; Disayathanoowat, Young, et al., 2012; Djukic et al., 2015; Gamboa & Figueroa, 2009; Hamdi et al., 2011; Jeyaprakash et al., 2003; Kwong & Moran, 2013, 2016; Pérez-pérez et al., 2013; Syed Yaacob et al., 2018; Vojvodic et al., 2013; Yun et al., 2014; Zheng et al., 2016, 2018). En el caso del presente estudio, diferentes especies de Firmicutes fueron encontrados entre los microorganismos identificados en todas las muestras tomadas de fuentes de colonias sanas y en los tres estados de deterioro (Figura 17). Esto concuerda con lo encontrado por Díaz et al. (2016) en donde del total de muestreo realizado en *Melipona quadrifasciata*, Firmicutes fue el grupo más abundante (73.4%),

Vallejo (2020) quien encontró un 90% de bacterias de este grupo en diferentes estadios de la *T. angustula*, y Ngalimat et al. (2019) quienes igualmente reportaron 90% de Firmicutes en bacterias aisladas de miel, polen y propóleo de *Heterotrigona itama*.

Los bacilos están incluidos dentro del phylum Firmicutes y son uno de los grupos más comunes en las muestras tomadas de colonias de abejas ya sean mieleras (Disayathanoowat, Yoshiyama, et al., 2012; Evans & Armstrong, 2006; Gilliam, 1997; Gilliam & Morton, 1978; Yoshiyama & Kimura, 2009), solitarias como *Centris flavofasciata*, *Crawfordapis luctuosa* y *Xylocopa californica arizonensis* (Gilliam, 1990) o sin aguijón como *Austroplebeia australis*, *Tetragonula carbonaria* o *Tetragonula hokingse* (Mills, 2018), *Melipona fasciata* (Gilliam et al., 1990), *Trigona hipogea* (Gilliam et al., 1985) y Vallejo (2020).

En múltiples estudios, el género *Bacillus* ha mostrado ser altamente importante para contrarrestar patógenos en colonias de *A. mellifera* (Alippi & Reynaldi, 2006; Evans & Armstrong, 2006; Sabaté et al., 2009; Senbagam et al., 2013; Yoshiyama & Kimura, 2009), así como también por ser un efectivo secretor de enzimas extracelulares, antibióticos y ácidos grasos que permiten también la transformación del polen y la mejora en la alimentación de la colonia (Gilliam, 1990; Gilliam et al., 1985). Esta relación simbiótica abeja-*Bacillus* se ha fortalecido a través del tiempo, y su registro más antiguo se conoce para la abeja sin aguijón extinta *Proplebeia dominicana*, encontrada en ámbar (Cano et al., 1994)

Dado que muchos bacilos han sido identificados como productores de metabolitos secundarios, y teniendo en cuenta su papel en las colonias de *A. mellifera*, es posible pensar que en *T. angustula* este grupo bacteriano también cumpla funciones metabólicas e inmunológicas.

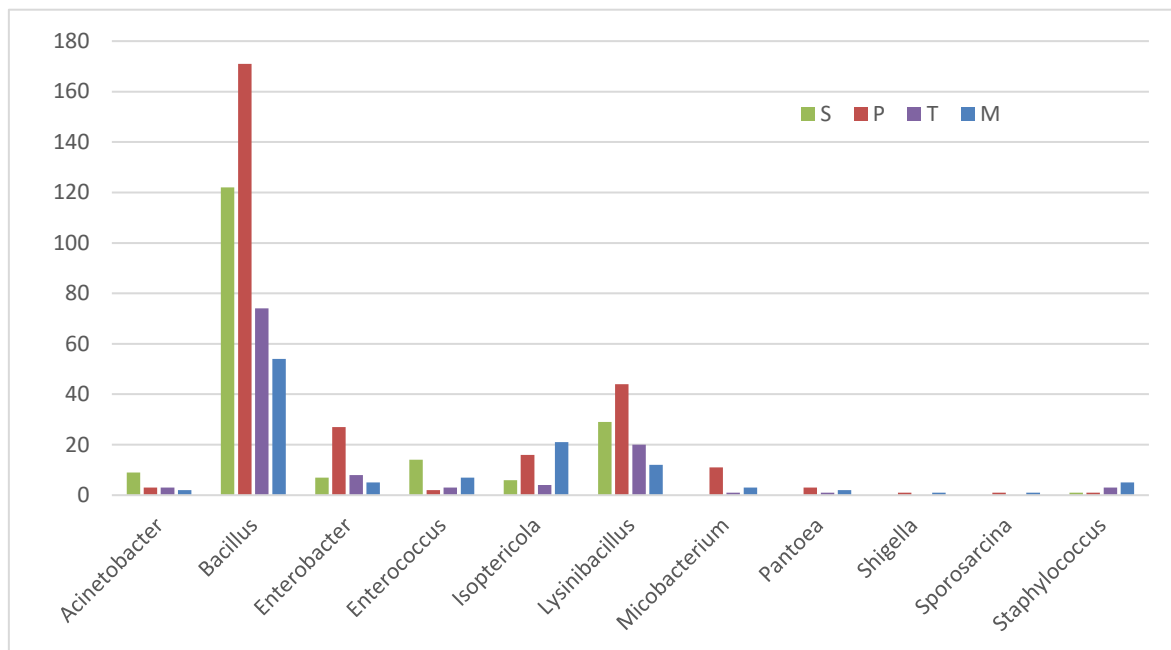


Figura 17 Frecuencia de los géneros identificados en cada estado de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía, M: muerte)

En total se identificaron hasta especie 11 aislados de *Bacillus* además de uno que solo fue posible su identificación hasta género.

Bacillus altitudinis (Shivaji et al., 2006): ha sido identificada como patógeno de peras y manzanas (Elbanna et al., 2014) y como posible biocontrolador de *Phytophthora sojae* (Lu et al., 2017). Ha sido aislada de muestras de suelo (Vijay Kumar et al., 2011) se reconoce la producción de enzimas proteolíticas (Hwang et al., 2016).

Bacillus aryabhatai: bacteria conocida por sus propiedades promotoras de crecimiento de plantas (Park et al., 2017; Xiang et al., 2017) y la capacidad de degradar insecticidas del suelo (Pailan et al., 2015). No solo ha sido aislada de suelo, sino también del ambiente del cultivo del camarón, en donde mostró propiedades antimicrobianas que mejoran las condiciones para la cría (Tepaamorndech et al., 2019). Se aisló inicialmente de criotubos de muestras tomadas en la estratosfera (Shivaji et al., 2009).

Bacillus amyloliquefaciens (Priest et al., 1987): bacteria no patogénica que se puede aislar de suelos y plantas. Fue registrada en el intestino del insecto palo *Diaphroedes gigantea*, cuya fuente de alimento son hojas de eucalipto y otras plantas (Ignasiak & Maxwell, 2017). Está relacionada con *Bacillus subtilis* (Tsuru, 1962) y tiene propiedades antifúngicas, principalmente en medios nitrogenados (Caldeira et al., 2007).

Bacillus cereus: bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente. Se conoce su presencia en suelos, plantas y en intestino de artrópodos como termitas, milpiés o cucarachas (Margulis et al., 1998), en áfidos (Dash et al. 1984), en el hemíptero *Cletus signatus* (G. Singh, 1974) y en *Crawfordapis luctuosa* (Hymenoptera – Colletidae) (Gilliam, 1990). Se conocen sus propiedades productoras de bacteriocinas que ayudan en *A. mellifera* a controlar la presencia de patógenos (Alippi & Reynaldi, 2006).

Bacillus firmus (Werner, 1933): bacteria Gram positiva que se puede aislar de múltiples ambientes, y que es utilizada en biotecnología ambiental para remover metales pesados de cuerpos de agua (Bachate et al., 2013), como biocontrolador de nemátodos (Castillo et al., 2013; Mendoza et al., 2008; Terefe et al., 2012), entre otras funciones. Hasta el momento solo se conoce de un reporte de patogenicidad en un lepidóptero (Varma, 1986), y su presencia en las provisiones larvales de la abeja *Centris pallida* (Gilliam et al., 1984) y abejas obreras (Gilliam & Morton, 1978).

Bacillus marisflavi (Yoon et al., 2003): se ha encontrado en el fondo del mar Amarillo en Corea, en suelos (Akayli et al., 2016) y se encontró en un lote enfermo de peces *Dentex dentex* cultivados para consumo humano (Akayli et al., 2019). Es un microorganismo poco estudiado.

Bacillus megaterium (De Bary, 1884): ha sido aislada de suelo y agua, de intestino de *A. mellifera* así como de alimento larval, polen y miel de *Trigona* sp. y *Mellipona fasciata* (Gilliam, 1990, 1997; Gilliam, 1979; Gilliam & Morton, 1978).

Bacillus mojavensis (Roberts et al., 1994): descubierta en muestras de suelo, es conocida por ser antagonista endofítica del hongo *Fusarium moniliforme*, lo que la hace buen

controlador biológico (Bacon & Hinton, 2002, 2011; Ma et al., 2012). También se han estudiado aplicaciones industriales para esta bacteria (Choi et al., 2011).

Bacillus pumilus: aislada del intestino y polen de *A. mellifera* (Gilliam, 1979; Gilliam & Morton, 1978), además de las secreciones orales del coleoptero *Dendroctonus rufipennis*, sirviendo como parte del control de hongos de las galerías abiertas por el insecto (Cardoza et al., 2006). Igualmente es una de las especies de bacteria más comunes en las provisiones larvales de *Trigona hipogea* (Gilliam et al., 1984).

Bacillus siamensis (Sumpavapol et al., 2010): bacteria Gram positiva aislada de alimentos asiáticos (Meidong et al., 2017) perteneciente al mismo grupo taxonómico de *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* (Fan et al., 2017). Puede producir compuestos antimicrobianos y antibacteriales, además de que puede promover el crecimiento de plantas (Jeong et al., 2012) y servir como suplemento alimenticio en acuicultura (Meidong et al., 2017).

Bacillus velezensis: Wang et al. (2008) determinaron al analizar bajo técnicas moleculares utilizando el gen que codifica para el 16S rARN, que no existen diferencias considerables que permitan separar a esta especie de *Bacillus amyloliquefaciens* y debe ser considerada como su sinónimo taxonómico posterior, pero más adelante Dunlap et al. (2016) rechazaron esta hipótesis argumentando que la publicación de *B. velezensis* fue previa a los reportes de *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* y '*Bacillus oryzicola*', siendo entonces estas últimas sinónimos taxonómicos posteriores a *B. velezensis*. Esta especie es conocida por ser promotora del crecimiento de plantas y supresora del crecimiento de patógenos (Fan et al., 2018; Grady et al., 2019; Rabbee et al., 2019).

Respecto a *Staphylococcus*, se encontraron en las colonias tres especies. Una de ellas, *S. gallinarum* (1983) ha sido reportada en pollos aunque también en *Rhizoecus amorphophalli* (Hemiptera: Pseudococcidae) (Sreerag et al., 2014). *S. haemolyticus*, es un agente infeccioso en humanos (Czekaj et al., 2015) y también en coleópteros (Yaman & Dem, 2016), pero se descartaría su acción patógena en las colonias muestreadas debido a su aparición exclusiva en una colonia en la fase final del deterioro. *S. saprophyticus*

(Fairbrother, 1940) también ha sido reportada en Pseudococcidos, pero además como parte de la microbiota del intestino de termitas que permite la digestión de celulosa (Paul et al., 1986). Esta especie es la que presenta un mayor cambio en su abundancia dentro del género y aunque no es de nuestro conocimiento que este microorganismo tenga la capacidad de producir algún metabolito secundario en respuesta a algún otro patógeno, sería de interés hacer esta evaluación.

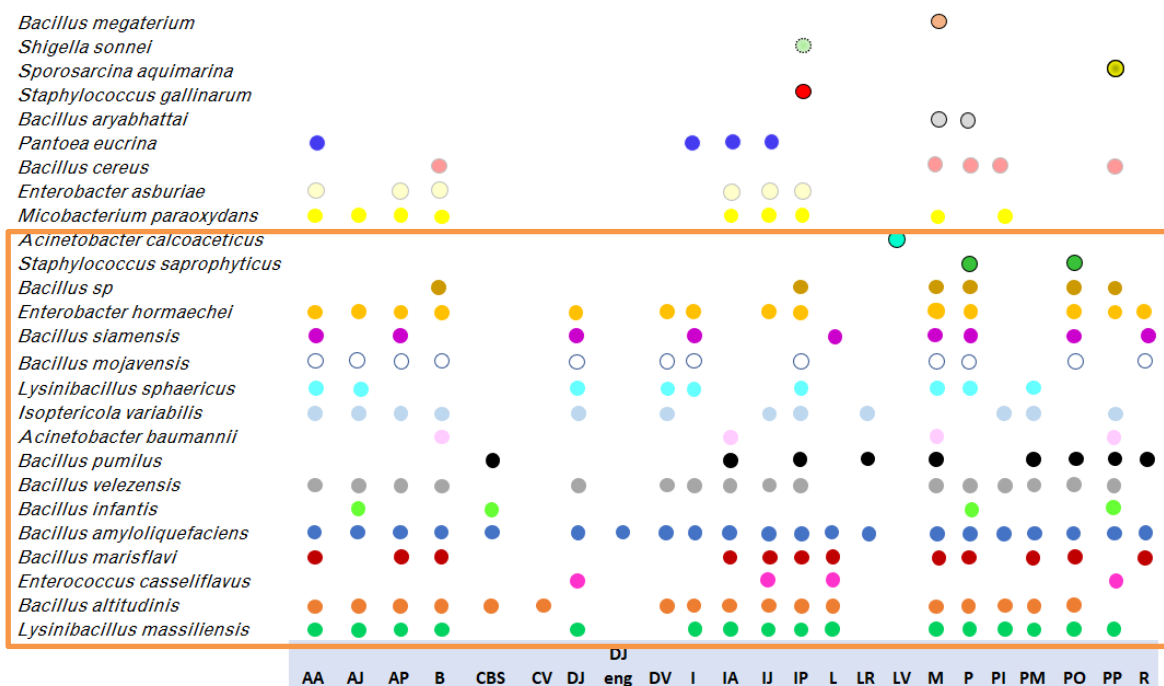
3.1.3 Gamaproteobacteria

Clase de bacterias incluida dentro del phylum Proteobacteria con más de 250 géneros de gran variedad morfológica y trófica que solo comparten la secuencia 16S rARN como carácter que define la clase (Garrity et al., 2005).

La relación que las abejas tienen con suelos y semillas posibilita que este tipo de bacterias que comúnmente se encuentran en esos sustratos, sean compartidos no solo con las forrajeras encargadas de visitar puntos externos a la colonia, sino también con abejas y fuentes dentro de la colonia (Ludvigsen et al., 2018; Maes et al., 2016; Powell et al., 2014; Raymann & Moran, 2018; Subotic et al., 2019).

Enterobacter hormaechei (O'Hara et al., 1989) es una Gamaproteobacteria ambiental Gram negativa encontrada principalmente en suelos. Se conocen sus propiedades estimulantes del crecimiento de raíz en tomate en terrenos salinos (Egamberdieva et al., 2014), de la solanácea *Withania coagulans* y de la oliva india *Olea ferruginea* (Ullah et al., 2017), así como su capacidad para limitar el crecimiento de *Fusarium* spp. (Przemieniecki et al., 2019). También ha sido aislada del intestino del hemiptero *Amrasca biguttula biguttula* específicamente en Bangalore- India (Sivakumar et al., 2016), de *Bombus* spp. (Praet et al., 2018) y de *Apis cerana indica* (Disayathanoowat, Yoshiyama, et al., 2012), *Enterobacter asburiae* (Brenner et al., 1986), aislada de suelos (Quadt-Hallmann et al., 1997), tiene la capacidad de degradar endosulfan, insecticida altamente residual (Abraham & Silambarasan, 2015). También ha sido aislada de intestino del cicadellido *Amrasca biguttula biguttula* (Sivakumar et al., 2016), de la polilla *Acherontia atropos* (Ignasiak & Maxwell, 2017) y de la plaga de granero *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) para la degradación del polietileno (Yang et al., 2014).

Tabla 5 Especies bacterianas aisladas de colonias con presencia del deterioro y su presencia por fuente. Se señala dentro del recuadro naranja las especies que también fueron aisladas en colonias sanas. (abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora [AP], detritos [B], materia blanca seca [CBS], celda vecina [CV], disco joven [DJ], disco joven engrosado [DJ eng], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP], larva [L], larva reina [LR], larva vecina [LV], miel [M], pupa [P], piquera [PI], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R], .).



Al comparar las bacterias encontradas en colonias sanas y colonias con deterioro, se observa un cambio en la distribución dentro de la colmena, y no es posible determinar a partir de los datos si se podría considerar algunas de estas como parte de la microbiota propia de *T. angustula*.

Se observó que la abundancia bacteriana general en colonias de la Hacienda fue mayor en comparación con los valores obtenidos en Santa Bárbara (Figura 18) y hubo diferencias significativas en la diversidad bacteriana encontrada en los dos sitios, siendo la Hacienda la que presentó un 40% más de géneros bacterianos (Figura 19)

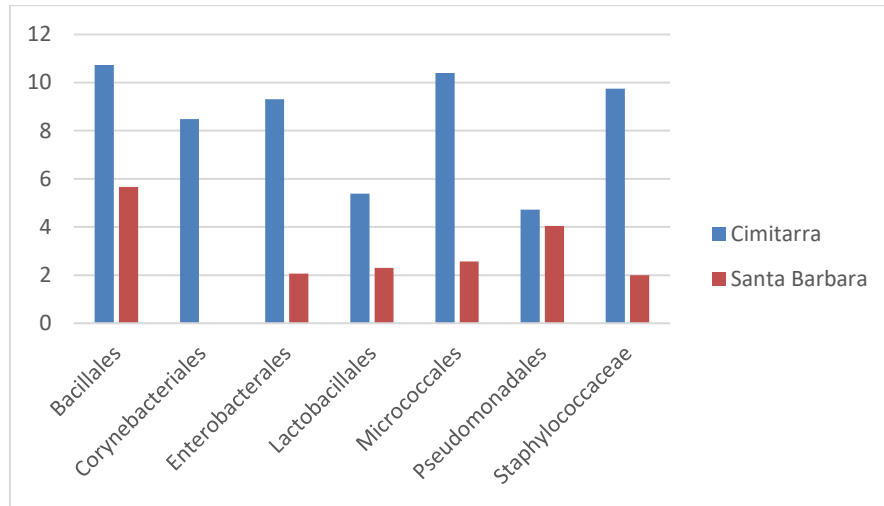


Figura 18 Comparación de la abundancia de bacterias por orden en las dos zonas de muestreo, siendo Cimitarra las colonias correspondientes a la Hacienda el Paraíso

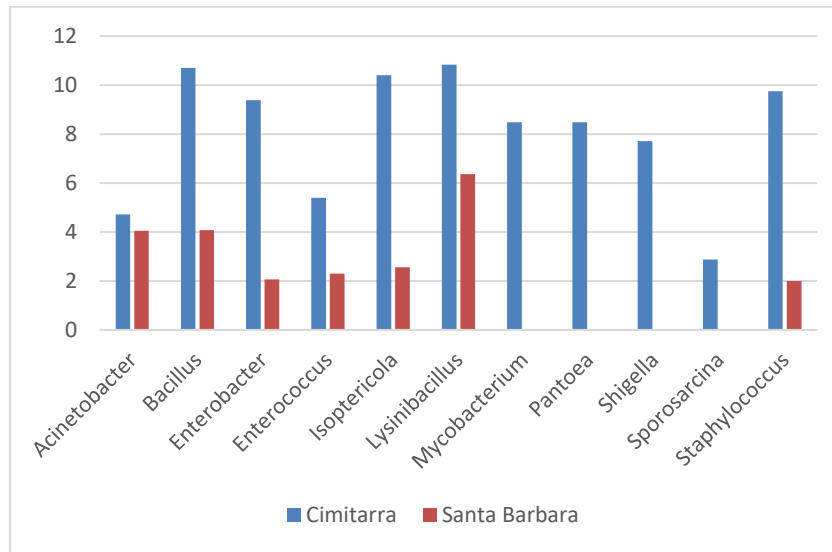


Figura 19 Diversidad de géneros bacterianos presentes en colonias de la Hacienda el Paraíso (Cimitarra) y Santa Bárbara

3.2 Variación de las abundancias bacterianas (UFC) según Fuente de aislamiento

Inicialmente se quería establecer si existía algún patrón en particular en la distribución de los microorganismos en las diferentes fuentes en los diferentes estados de deterioro.

Se esperaba que, al realizar los escalamientos multidimensionales (MDS) por estado de deterioro, hubiera una agremiación de los puntos correspondientes a las abundancias de los morfotipos encontrados en colonias con presencia del deterioro y una separación respecto a los encontrados para colonias sanas. Este no fue el caso, sino que, por el contrario, los puntos fueron representados de manera dispersa y entremezclando los morfotipos encontrados al comparar entre todos los estados del deterioro (Figura 20) fuentes de aislamiento y localidad. Ninguno de esos análisis arrojó resultados que pudieran sugerir la presencia de un patógeno en las colonias.

Un resultado similar fue encontrado por Koch et al. (2012) al comparar la composición de los microorganismos asociados a *B. terrestris* sanos y *B. terrestris* infectados con *Nosema bombi*, en donde no hubo diferencias significativas, aunque ellos no tuvieron en cuenta datos cuantitativos de las bacterias aisladas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se tomó la decisión de analizar el comportamiento de las especies bacterianas encontradas en cada una de las fuentes por separado, poniendo particular atención en la dinámica de su abundancia y la diversidad entre estados de deterioro.

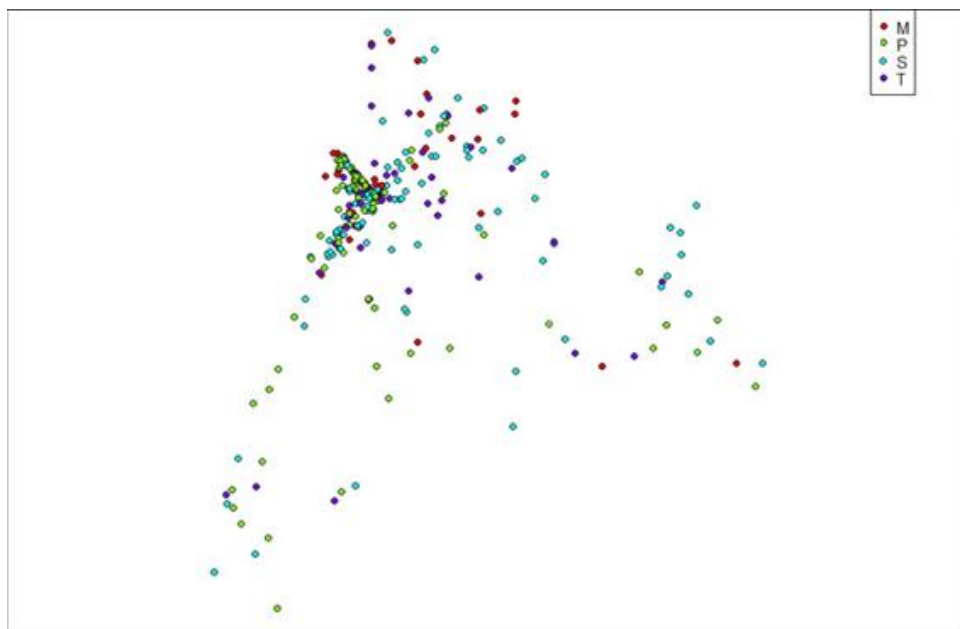


Figura 20 MDS para los aislamientos por estado de deterioro en donde las distancias entre los puntos representan la similitud en los valores de abundancia

Para el análisis, inicialmente se observaron los valores de abundancia total de microorganismos por estado de deterioro, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes estados. En cuanto a la diversidad bacteriana encontrada en las muestras tomadas de colonias sanas, larvas e intestino de pecoreadoras resultaron ser las fuentes más similares entre ellas, mientras que la entrada (piquera), la resina y la cera fueron las más distantes (Figura 21).

En las colonias clasificadas en el estadio temprano de deterioro, fuentes que no aparecían relacionadas en las colonias sanas, se muestran con mayor grado de similitud, como por ejemplo las muestras de abejas o los intestinos de las diferentes abejas (Figura 22). Para poder hacer un análisis comprensivo de este fenómeno, se dividieron las muestras en tres grupos, el componente insecto que corresponde a las abejas completas e intestinos extraídos, larvas y pupas, el componente alimento que corresponde a miel, polen y potes de miel y polen y por último todas las muestras de tipo estructural como el involucro, la resina, los discos de cría, la piquera y detritos.

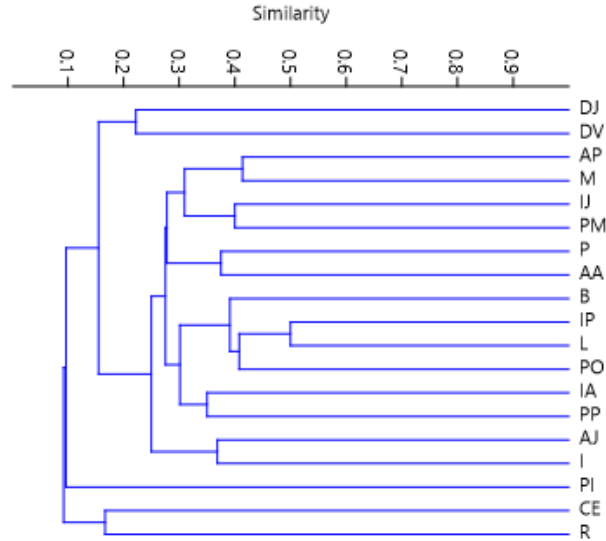


Figura 21 Similitud de la diversidad bacteriana encontrada en las diferentes fuentes en colonias sanas (disco joven [DJ], disco viejo [DV], abeja pecoreadora [AP], miel [M], intestino de juvenil [IJ], pote de miel [PM], pupa [P], abeja adulta [AA], detritos [B], intestino de pecoreadora [IP] larva [L], polen [PO], intestino de adulta [IA], pote de polen [PP], abeja juvenil [AJ], involucro [I], piquera [PI], cera[CE], resina [R])

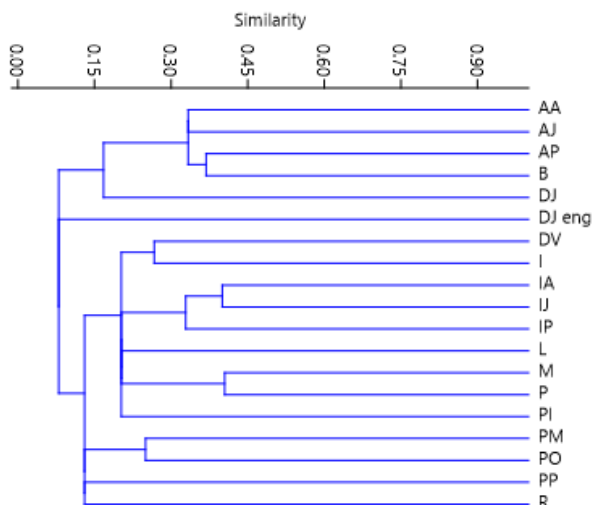


Figura 22 Similitud de especies bacterianas aisladas de fuentes tomadas de colonias clasificadas con deterioro temprano (abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora [AP], detritos [B], disco joven [DJ], disco joven engrosado [DJeng], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP] larva [L], miel [M], pupa [P], piquera [PI], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R])

En general se pudo evidenciar variaciones en las abundancias de los microorganismos aislados y en la composición de la microbiota asociada a las fuentes en los diferentes estados de deterioro, las cuales detallaremos a continuación:

3.2.1 Microorganismos asociados a las obreras de abejas angelitas (*T. angustula*)

De las abejas adultas (AA), abejas juveniles (AJ) y abejas pecoreadoras (AP) en colonias sanas se aislaron 38 morfotipos y en colonias con presencia de deterioro, 37, algunas de las cuales

Se encontró que *Bacillus altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. marisflavi* y *L. massiliensis* están presentes como simbioses en los tres tipos de abejas tanto sanas como en colmenas con deterioro, aunque *B. amyloliquefaciens* no pareciera estar alojada en los intestinos de abejas juveniles sanas. *B. velezensis* aparentemente se encuentra distribuida más ampliamente en abejas de colonias enfermas respecto a lo observado en abejas sanas y *Microbacterium paraoxidans*, ausente en colonias sanas, se aisló de todas las abejas e intestinos en colonias con señales de deterioro (Tabla 6). Hasta el momento,

ninguna de esas especies ha sido asociada directamente con abejas, pero no es sorprendente su presencia dado que todas tienen relación con plantas y suelos a las que posiblemente tienen acceso las abejas forrajeras.

La distribución y abundancia de los microorganismos está definida por el ambiente en el que se encuentran, así como por las relaciones que tienen con otros microorganismos (Palacios-López et al., 2011). Su respuesta puede estar condicionada tanto a la presencia de daño celular (competencia por interferencia) o al estrés fisiológico (competencia por explotación de recursos), posiblemente causado por otro organismo (Cornforth & Foster, 2013). Por ejemplo, Hubert et al. (2017) encontraron un cambio significativo en la microbiota de *A. mellifera* relacionado con la presencia de parásitos y de factores geográficos y ambientales. Teniendo en cuenta lo anterior, al remover la variable geográfica y ambiental al analizar exclusivamente las colonias encontradas en la Hacienda el Paraiso, la variación de la abundancia de *B. velezensis*, *B. altitudinis*, *B. amilolyquefaciens*, *I. variabilis* y *L. massiliensis* en los diferentes estados de deterioro, puede estar indicando la presencia de algún agente externo que causa disrupción en la homeóstasis de los simbiositos de las abejas. Esta tendencia se observa no solo en abejas adultas completas (Figura 23) sino también en abejas juveniles (Figura 24) y las pecoreadoras (Figura 25), en donde el incremento de abundancia de las especies presentes es evidente.

Al igual que en las abejas mieleras (Gilliam, 1997), en las colonias sanas se encontró una mayor presencia bacteriana en abejas pecoreadoras respecto a las juveniles mientras que lo opuesto se reflejó en las colonias con señales de deterioro tanto en la etapa temprana, como en la etapa tardía (Figura 26). Al comparar la diversidad de bacterias asociadas entre los tipos de abejas, en las colonias sanas se encontró que las abejas juveniles (AJ) tienen un 20% de similitud respecto a adultas (AA) y pecoreadoras (AP). Al hacer la misma comparación en colonias con presencia de las señales de deterioro en etapa temprana se da un ligero incremento en la similitud AJ-AA-AP (33%) pero al avanzar el deterioro la similitud entre AJ y AP es considerablemente menor (16%) que AJ y AA que permaneció estable. Esta variación no solo se dio a nivel de número de especies, sino que también las bacterias presentes en la etapa tardía aparecen con valores menores de abundancia (Figura 26). AA y AP de colonias sanas muestran un 34% de similitud en colonias sanas,

porcentaje mucho menor que el encontrado por Vallejo (2020), posiblemente por la diferencia en la cantidad de morfotipos aislados de las muestras de cada estudio.

Tabla 6 Especies de bacterias aisladas de abejas completas o solo de los intestinos de abejas de colonias sanas y colonias en etapa temprana (P) y etapa tardía (T) del deterioro. Se señalan en gris las especies compartidas por las abejas completas e intestinos en las diferentes colonias, y se marcan con una estrella naranja las cuatro especies de bacterias encontradas solo en abejas de colonias con presencia de deterioro.

Especies	Colonias sanas						Colonias P y T					
	AA	AJ	AP	IA	IJ	IP	AA	AJ	AP	IA	IJ	IP
<i>Acinetobacter baumannii</i>		X						X		X		
<i>Bacillus altitudinis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus infantis</i>	X		X	X	X		X					
<i>Bacillus marisflavi</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Bacillus mojavensis</i>	X		X			X	X	X				X
<i>Bacillus pumilus</i>	X		X			X				X		X
<i>Bacillus siamensis</i>			X				X		X	X		
<i>Bacillus sp</i>		X										X
<i>Bacillus velezensis</i>		X		X		X	X	X	X	X	X	X
★ <i>Enterobacter asburiae</i>							X		X	X	X	X
<i>Enterobacter hormaechei</i>				X			X	X	X		X	X
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	X	X		X		X				X	X	
<i>Isoptericola variabilis</i>	X			X			X	X	X		X	X
<i>Lysinibacillus massiliensis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>				X			X	X				X
★ <i>Microbacterium paraoxydans</i>							X	X	X	X	X	X
<i>Pantoea eucrina</i>							X			X	X	
★ <i>Shigella sonnei</i>												X
★ <i>Staphylococcus gallinarum</i>												X
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>						X		X		X		

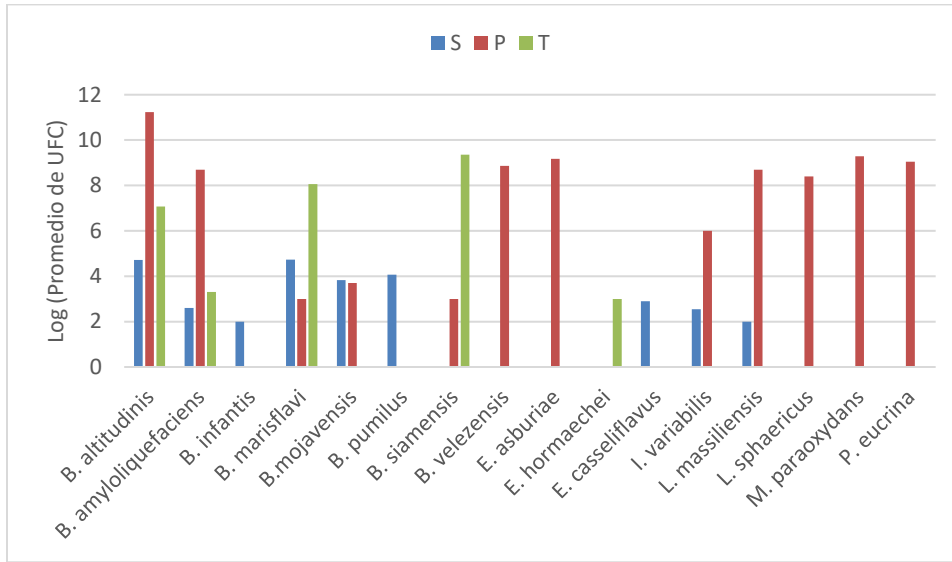


Figura 23 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas adultas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

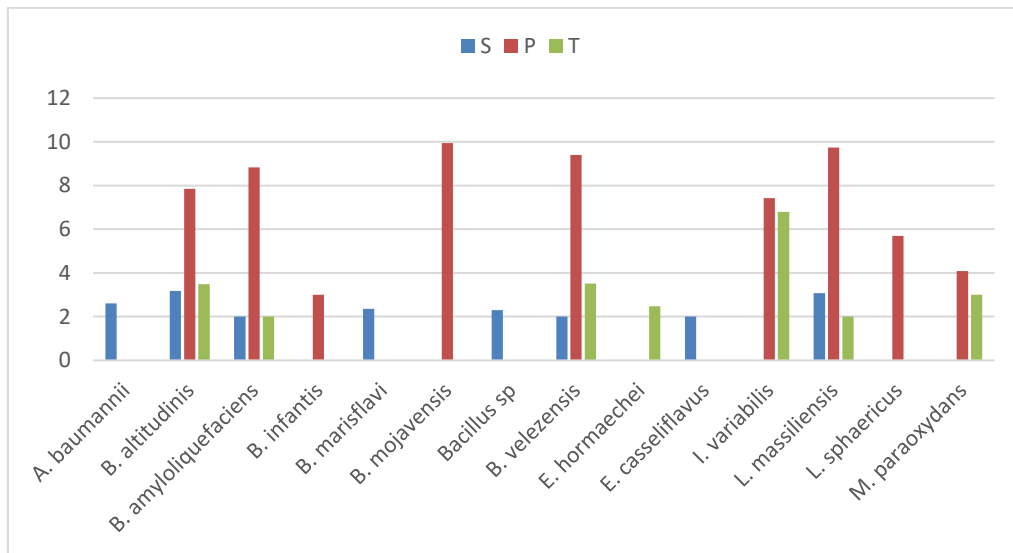


Figura 24 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas juveniles (AJ) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

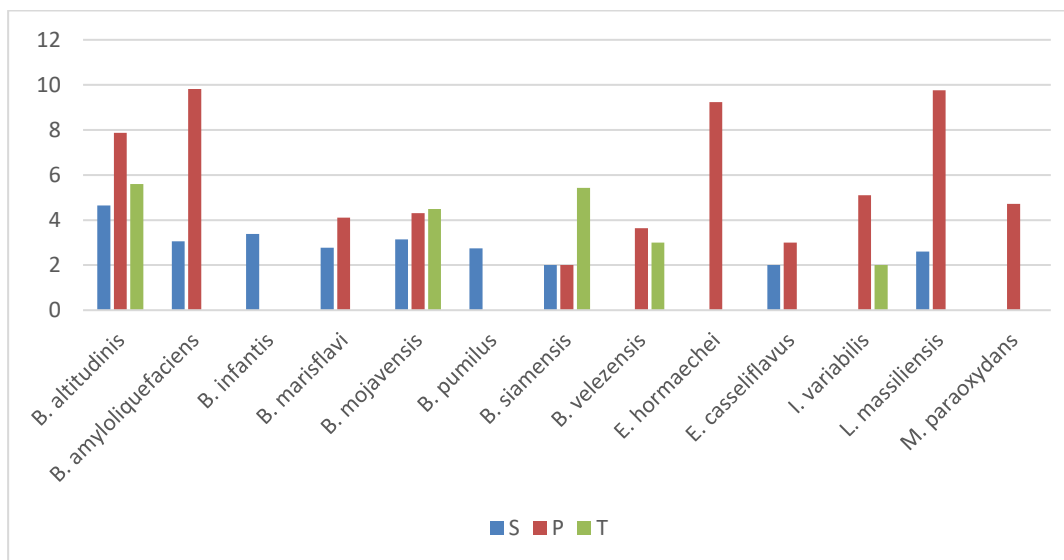


Figura 25 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de abejas pecoreadoras completas (AP) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

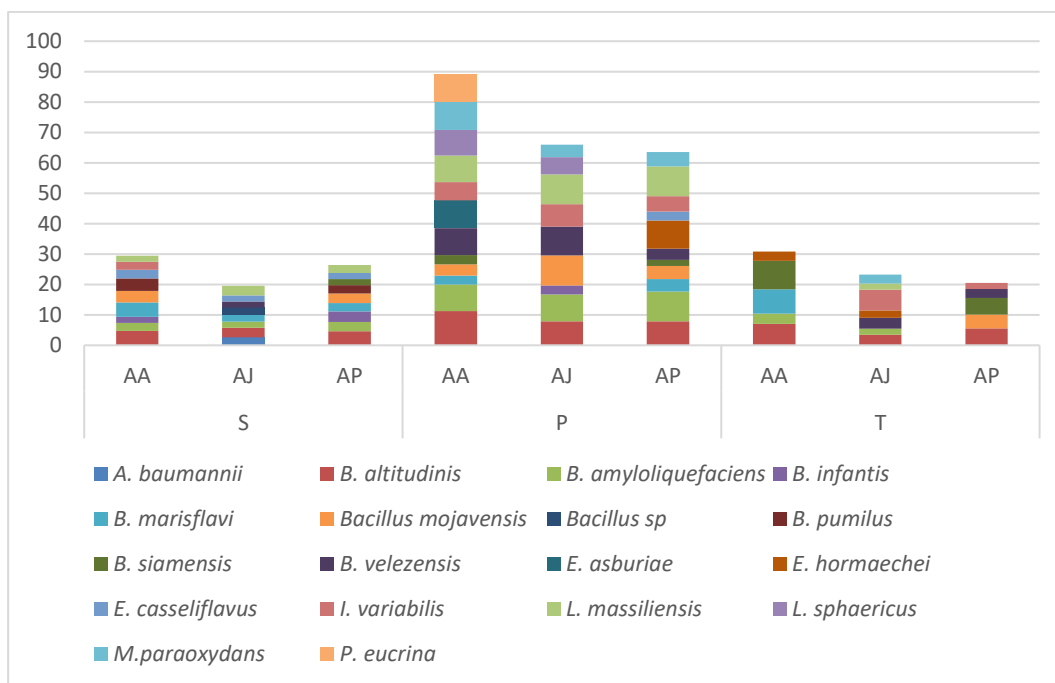


Figura 26 Diversidad y abundancia de bacterias encontradas por fuente (abeja adulta (AA), pecoreadora (AP) y juvenil (AJ)) en cada uno de los estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

El incremento de la abundancia de algunas de las especies bacterianas durante la etapa temprana de deterioro podría ser parte del comportamiento conocido como provocación bacteriana, en el que un microorganismo del hospedero ataca a un invasor, para que este

reaccione al ataque y desate la producción de metabolitos secundarios por parte del resto de la microbiota asociada al hospedero o ecosistema para eliminarlo (Gonzalez et al., 2018). La provocación bacteriana no es el único mecanismo que tienen los microorganismos dentro de un hospedero para inducir una respuesta por parte de las otras células bacterianas en situaciones de estrés. La percepción de cuórum es la habilidad de detectar y responder ante la densidad celular regulada por la producción, secreción y detección de señales autoinductoras que monitorean la densidad de las células y la complejidad en la población en el ecosistema (Hawver et al., 2016). Este tipo de comunicación permite coordinar a todas las células bacterianas para que haya un comportamiento de grupo y que exista una regulación colectiva de la expresión de genes en respuesta a señales provenientes del ecosistema (Braga et al., 2016) con miras a ser efectivos en cuanto a la vigilancia, la supervivencia y la adaptación de los microorganismos en el ecosistema (Bassler & Vogel, 2013). Basados en lo anterior, se podría pensar que durante la etapa temprana hay una activación de la percepción del cuórum que estimula el incremento celular en el hospedero. Independientemente de cuál sea el mecanismo que estimula el crecimiento bacteriano, la reducción drástica de la microbiota en la etapa tardía podría estar indicando un efecto colateral, ya sea por la afectación de la microbiota asociada a *T. angustula* por efecto de los metabolitos secundarios producidos en el entorno (Gonzalez et al., 2018) o por el avance del patógeno no detectado entre las muestras.

Observaciones realizadas en las colonias de la Hacienda, permitieron identificar que algunas de ellas permanecieron en la etapa temprana de deterioro por cierto tiempo antes de recuperarse o de pasar a la etapa tardía y posterior muerte de la colonia (Rosso-Londoño, Com. pers. 2020), lo que podría estar indicando una respuesta del sistema inmune de la colonia para contrarrestar el deterioro. Podría pensarse que en los casos en los que las colonias se recuperan, el sistema inmune de la colonia ha sido capaz de recuperar el equilibrio microbiológico o de someter al patógeno, por el contrario, las colonias en las que finalmente hay un avance del deterioro muestran el patrón de aumento inicial y reducción final de los microorganismos. Este tipo de respuesta se ha observado en la microbiota de *Apis cerana* al comparar abejas infectadas con *Nosema ceranae* y abejas sanas, en donde las cantidades de *Bifidobacterium* y *Pasteurellaceae* se ven reducidas en presencia del microsporidio (Li et al., 2012).

Esta misma tendencia del cambio en los microorganismos se puede observar al comparar las bacterias presentes en cada una de las muestras de intestinos de diferentes abejas en las diferentes etapas de deterioro. En intestino de abejas adultas (IA), pecoreadoras (IP) y juveniles (IJ) de colonias sanas, se registraron 26 morfotipos (12 identificados a especie), mientras que en muestras con presencia del deterioro se aislaron 42 (18 identificados a especie).

Tanto en IA (Figura 27) IJ (Figura 28) e IP (Figura 29) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.005$) en la abundancia de las especies bacterianas encontradas en colonias sanas respecto a los valores más altos encontrados en etapa temprana, y la reducción de los mismos en la etapa tardía. Hubert et al. (2017) proponen que, tomando en cuenta el grupo de microorganismos propios de la especie y aquellos que tienen variación en cuanto a su presencia, si hay un aumento de los primeros, estaríamos hablando de protección al hospedero, mientras que si aumentan los segundos, se podría calificar como disbiosis. En ese sentido, se debería caracterizar la microbiota de *T. angustula* para establecer cuales microorganismos están asociados siempre a las abejas angelitas y establecer si esos son los que están variando en este caso.

Se conocen aproximadamente nueve grupos bacterianos compartidos por diferentes especies de abejas corbiculadas del género *Apis* y *Bombus*: abundantemente los cluster de Proteobacterias *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella apicola* y Firmicutes *Lactobacillus* Firm-4 y *Lactobacillus* Firm-5 (Kwong & Moran, 2013, 2016; Martinson et al., 2011; Moran et al., 2012). En menor cantidad, pero siempre presentes los cluster de la Actinobacteria *Bifidobacterium asteroides* (Bottacini et al., 2012). Los cuatro cluster restantes corresponden a la Proteobacteria *Frischella perrara* (Engel et al., 2013), *Bartonella apis* (Kešnerová et al., 2016), *Parasaccharibacter apium* (Corby-Harris, Snyder, et al., 2014), y bacterias del género *Gluconobacter* (Martinson et al., 2011). En obreras de *A. mellifera*, ocurren tres de los nueve clusters bacterianos conocidos: Beta, Firm-5, and Gamma-1 (Martinson et al., 2012), *Lactobacillus* (Firm 4) y las Bifidiobacterias son más abundantes en Nodrizas (juveniles) y adultas encargadas del procesamiento de alimento y las Proteobacterias son más abundantes en adultas procesadoras de alimento *Bartonella* ha sido encontrada mayormente en procesadoras de alimento (Jones, Fruciano, Marchant, et al., 2018). Todos estos estudios realizaron la caracterización de la microbiota a partir de la

extracción de ADN de las muestras, y no por aislamiento de los microorganismos en los medios de cultivo, razón por la cual no podemos asegurar que representantes de los nueve grupos estén ausentes en *T. angustula*.

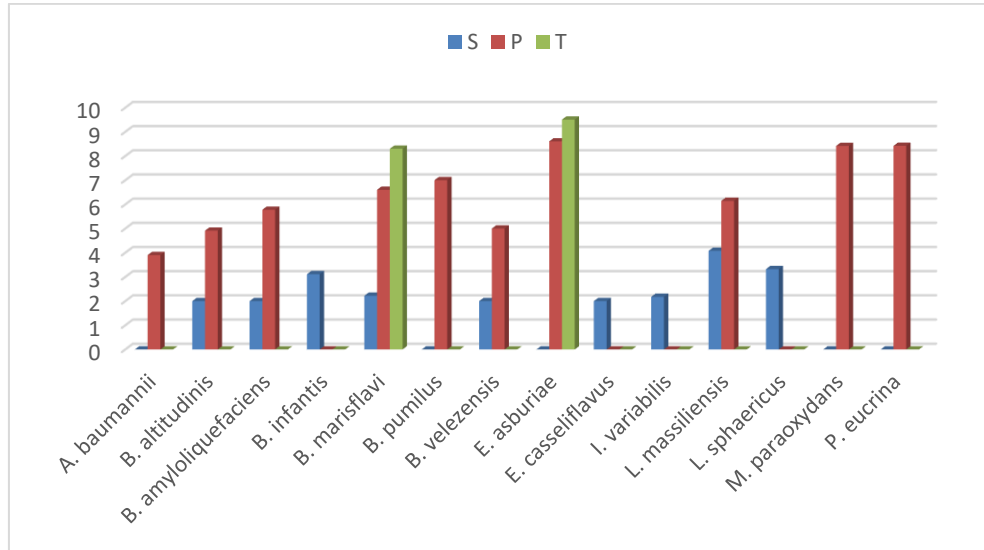


Figura 27 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de adultas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

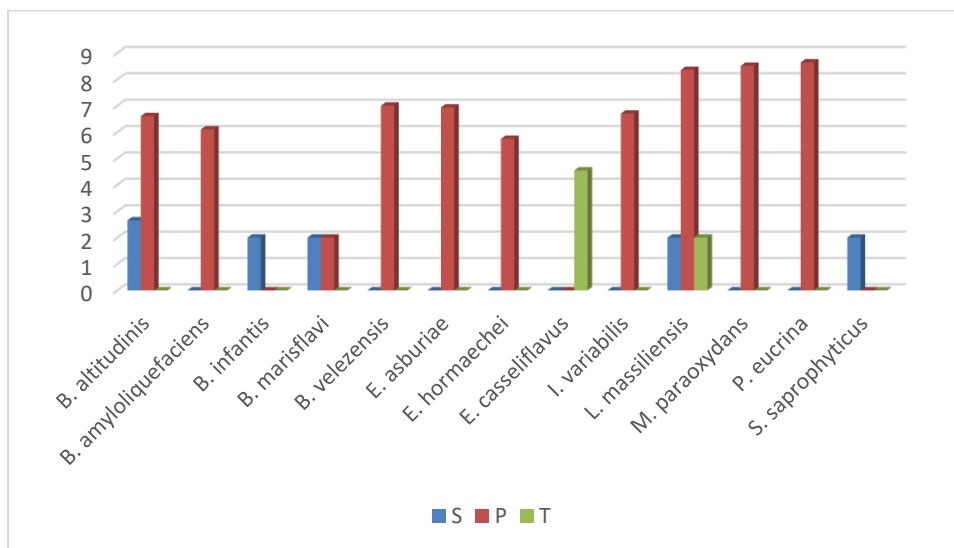


Figura 28 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de juveniles en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

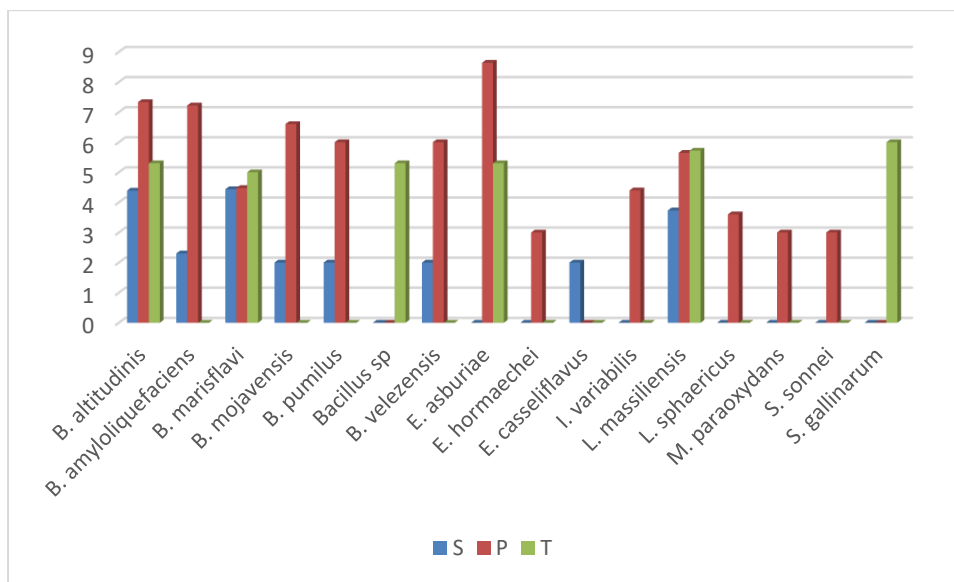


Figura 29 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Intestino de pecoreadoras en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

En colonias sanas la similitud en la diversidad bacteriana entre larvas (L) y pupas (P) no superó el 30% según el índice de Jaccard, análogo a lo encontrado entre larvas y los intestinos de abejas pecoreadoras (IP) con 10 morfotipos coincidentes. Vojvodic, Rehan & Anderson (2013) y Xu, Wu, Guo & Li (2014) también encontraron coincidencia en los

filotipos bacterianos aislados de adultos y de larvas en abejas africanizadas y europeas, así como Hroncova *et al.* (2019), no encontraron diferencias entre las bacterias aisladas de pupas y larvas. En los estados más avanzados del deterioro, el índice de Jaccard entre L y P se redujo ligeramente (20%).

Las larvas presentaron en colonias sanas 24 morfotipos de los cuales 7 fueron identificados (Figura 30), y al comparar con larvas de colonias con presencia del deterioro se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la carga bacteriana de las muestras. Vallejo (2020) solo reportó dos morfotipos bacterianos en larvas, uno de los cuales es *Bacillus flexus*, el cual no fue encontrado en las bacterias identificadas de este estudio.

En el análisis de las pupas sanas y con presencia del deterioro, al igual que en las muestras de abejas e intestinos, también fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.005$), siendo notorio en las pupas el incremento en diversidad y abundancia durante la etapa temprana de deterioro. Comparativamente, Vallejo (2020) encontró únicamente un morfotipo en las pupas, lo que contrasta con los 9 morfotipos aislados en el presente estudio, de los cuales fueron identificados 4 (Figura 31).

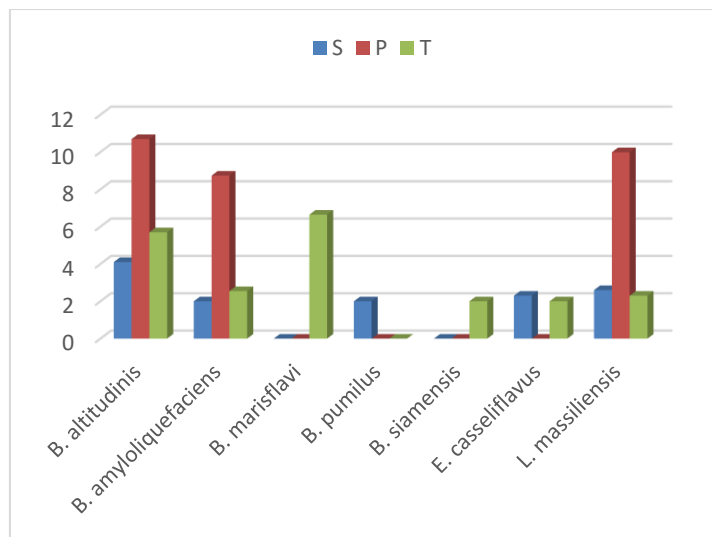


Figura 30 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de larvas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

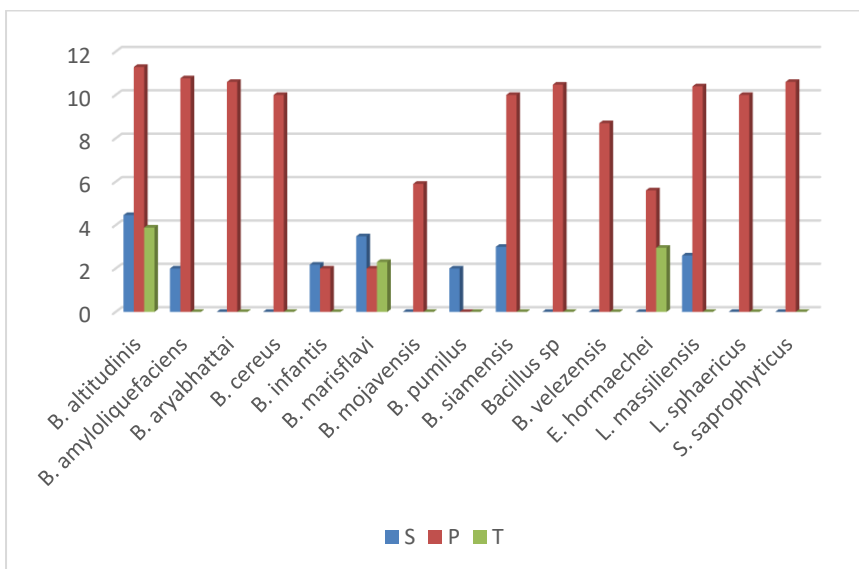


Figura 31 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de pupas en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

3.2.2 Microorganismos asociados al alimento

La Miel [M], polen [Po], potes de miel [PM] y potes de polen [PP] no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas en cuanto a la abundancia y la diversidad de microorganismos en las colonias sanas.

En la miel de colonias sanas fueron aislados 18 morfotipos bacterianos, mientras que en colonias con muestras de deterioro el total de morfotipos aislados fue de 38 en su mayoría de la etapa temprana. En total de las muestras de miel fueron identificados 18 morfotipos, de los cuales *A. baumani*, *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. marisflavi*, *B. siamensis*, *E. hormaechei*, *I. variabilis* y *L. massiliensis* se encontraron tanto en colonias sanas como en etapa temprana (Figura 32). Al observar la variación de *L. massiliensis* en todas las muestras del estudio, se encontró presencia de la especie en casi todas las muestras sanas, con excepción de la piqueta y la resina, y en la mayoría su abundancia se incrementó en las colonias categorizadas dentro de la etapa temprana de deterioro y se redujo en la etapa tardía. Esta especie bacteriana conocida antes como *B. massiliensis*, es una bacteria Gram positiva que generalmente se encuentra en el ambiente y no se considera patógena. Ha sido propuesta por Belur et al. (2012) para ser utilizada en biorreactores como productora de tanasa, componente importante de la fabricación de

drogas antimaláricas. También se ha observado que su presencia en suelos contaminados con compuestos orgánicos se puede incrementar, si estos son tratados mediante micoremediación usando hongos como *Botryosphaeria rhodina* o *Pleurotus pulmonarius* (Federici et al., 2007).

Pertenece al mismo género que *L. sphaericus*, (Ahmed et al., 2007) previamente conocido como *Bacillus sphaericus* (Gilliam & Morton, 1978), y que también fue aislada de muestras de miel en este estudio. Esta especie es una bacteria con cepas tóxicas y saprofitas, de las que se conoce su alto potencial biotecnológico no solo como controlador de los culícidos *Anopheles* sp., *A. aegypti* y *C. quinquefasciatus* (Ferreira et al., 2015; Jurat-Fuentes & Jackson, 2012), sino también como biodegradador de petróleo (Manchola & Dussán, 2014) y como bacteria resistente a los metales pesados con efectos larvicidas (Lozano & Dussán, 2013). Ha sido aislada del tejido abdominal de *A. mellifera* (Gilliam, 1997), de *Bombus* (Praet et al., 2018) e incluso de muestras de la abeja sin aguijón *Proplebeia americana* (Hymenoptera, Apidae) encontradas en ámbar (Cano & Borucki, 1995). Una cepa fue identificada como productora de un metabolito tóxico para la cucaracha *Blattaria germanica* (Nishiwaki et al., 2007). Al ser utilizado como controlador de *Anopheles*, los resultados no evidenciaron un efecto negativo en otros insectos asociados al cuerpo de agua tratado, pero el efecto sobre las larvas de *Anopheles* fue contundente (Ferreira et al., 2015). *L. sphaericus* es potencialmente nociva para *T. angustula* dada la patogenicidad encontrada por Shanks et al. (2017) en *Tetragonula carbonaria*. Realizando una comparación con la descripción del síndrome descrito por estos autores, las características de deterioro no parecen similares y no se tienen evidencias que incriminen en este caso a *L. sphaericus* como la causante del deterioro de las colonias. Los autores reportan cambios en la estructura de construcción de los discos de cría, larvas descoloridas, celdas abiertas con larvas de apariencia fluida, además de poca movilidad de las abejas y un olor a putrefacto. Para descartar su posible relación con

el deterioro, sería conveniente evaluar la capacidad patogénica de la cepa colombiana, y extender la evaluación a *L. massiliensis*.

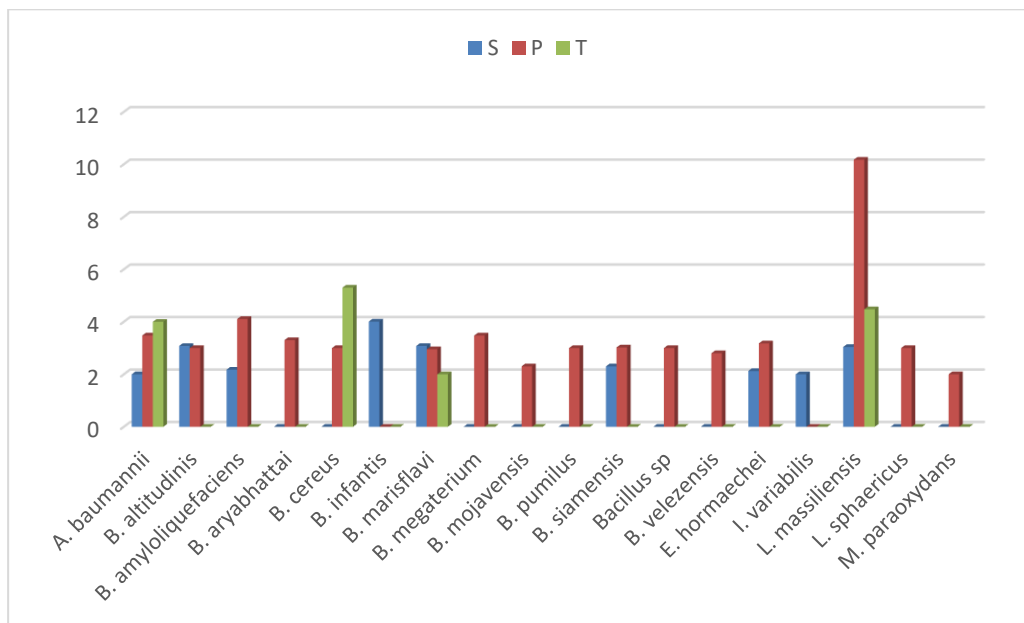


Figura 32 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de miel (M) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

En miel de *A. mellifera*, Lusby et al. (2005) encontraron actividad bactericida contra *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella californica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, Chanchao (2000) describió la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* en miel de *Apis dorsata*, Gamboa y Figueroa (2009) describieron la capacidad antibacteriana de la miel de *T. angustula* frente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, así como contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *Kocuria rhizophila*, y para la misma especie de abeja así como para *Melipona becheii*, Zamora et al. (2014) observaron la capacidad de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Miorin et al. (2003) también observaron la inhibición de *S. aureus* al utilizar miel de *T. angustula* pero también reportaron que la miel de *Trigona* spp. tiene actividad bactericida contra *E. coli*, *B. brevis*, *M. luteus* y *B. megaterium*.

A pesar del amplio espectro de microorganismos inhibidos por la miel de abejas, la miel es fuente de gran variedad de bacterias que se adaptan a las condiciones de acidez,

humedad, hiperosmolaridad entre otros (Olaitan et al., 2007). Algunas de las bacterias aisladas han mostrado tener potencial inhibitorio contra otras bacterias y hongos. Por ejemplo, de miel de *A. mellifera* se aislaron *Bacillus* y *Paenibacillus* capaces de inhibir el crecimiento del hongo *Ascosphaera apis* (Reynaldi et al., 2004), *Lactobacillus* spp. aislados de miel e intestinos, impidieron el crecimiento de *E. coli* y *Salmonella enterica* (Salgado-Silva et al., 2017) y múltiples bacterias del género *Bacillus* fueron efectivas en diferentes grados ante *P. larvae* (Alippi & Reynaldi, 2006). Otros microorganismos aislados de miel de *A. mellifera* son, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *B. megaterium*, *B. alvei* (Gilliam et al., 1990) y gran cantidad de hongos, algunas levaduras, probióticos, *Gluconobacter* y *Pseudomonas* (Salgado-Silva et al., 2017; Sinacori et al., 2014).

En cuanto a mieles de abejas sin aguijón, Gilliam et al. (1990) aislaron de *Melipona fasciata* *B. megaterium*, *B. circulans*, y *B. alvei*, Ngalimat et al. (2019) encontraron en miel de *Heterotrigena itama* 37 bacterias del phylum Firmicutes y una actinobacteria, de las cuales únicamente *B. cereus* HD1, *B. altitudinis* BD4, *B. amyloliquefaciens* PD9 and *B. safensis* BD9, mostraron actividad antimicrobial. Pucciarelli et al. (2014) encontraron en miel de *T. angustula*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *E. coli* y *Salmonella*, bacterias que no fueron aisladas en este estudio y que, según los autores pudieron haber llegado a sus muestras debido al almacenamiento o manipulación indebida de las muestras. También en *T.*

angustula Cambroner-Henrichs et al. (2019) aislaron cinco actinobacterias y Olaya et al. (2014) aislaron *Clostridium perfringens* y *E. coli*.

En comparación con la miel, la diversidad bacteriana aislada del material del que se componen los potes de miel (PM) fue menor, y con gran variabilidad en la carga bacteriana de las colonias ($p < 0.005$) al comparar todos los estados de deterioro.

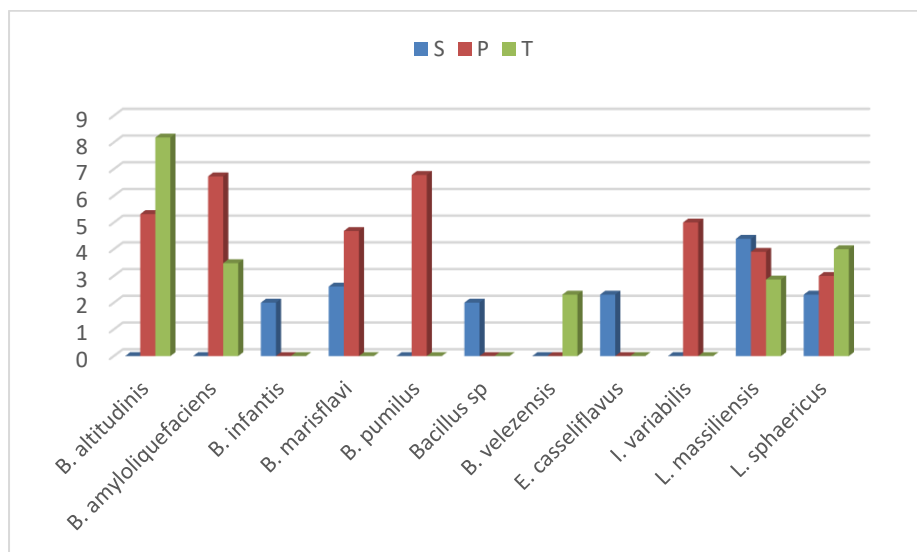


Figura 33 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Pote de Miel (PM) en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

De esta fuente se aislaron 13 morfotipos de colonias sanas y 19 de colonias deterioradas. Se seleccionaron 11 morfotipos para identificación, de los cuales hubo siete especies de bacilos, destacando nuevamente la abundante presencia de *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*. A diferencia de lo encontrado en la miel, *L. massiliensis* fue encontrado

en colonias sanas, se redujo su abundancia en colonias con etapa temprana de deterioro y volvió a incrementarse en la etapa tardía.

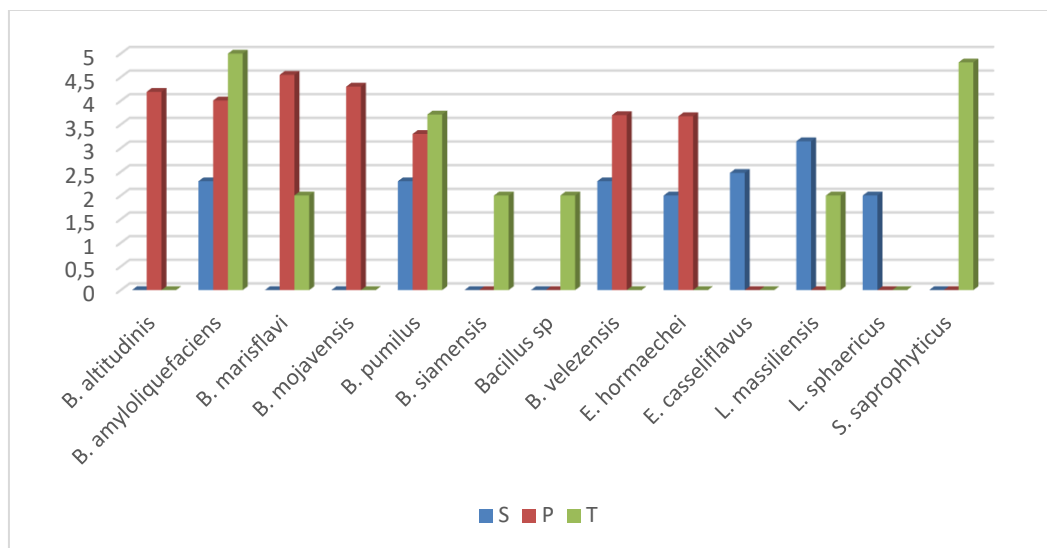


Figura 34 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Polen en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

El polen (PO) es una de las fuentes que ha sido más utilizada para realizar estudios, pues su contenido microbiológico es esencial para la alimentación y salud de la colonia (Dharampal et al., 2019; Ngalimat et al., 2019; Voulgari-Kokota et al., 2019). Dichos microorganismos provienen de las flores que las abejas visitan, pasando por transmisión horizontal (Anderson et al., 2013)

En las muestras de este estudio, del polen de colonias sanas fueron aislados 16 morfotipos (7 identificados) a especie, mientras que en colonias con evidencia de deterioro se aislaron 29 morfotipos, de los cuales 11 fueron identificados (Figura 34). Hay diferencias significativas en la abundancia de microorganismos por etapa del deterioro en las muestras de polen al comparar colonias sanas, con colonias deterioradas, especialmente de tres especies de *Bacillus* y una de *Staphylococcus* que inicialmente no se encontraban en las muestras de polen de colonias sanas. En los microorganismos del polen seleccionados para identificación, no se encontraron actinobacterias a diferencia de las *Actinocatenisporas*, una *Gordonia*, una *Nocardiopsis*, tres *Micromonosporas* y *Streptomyces* sp. reportadas por Cambroner-Henrichs et al. (2019) en polen, potes de miel, detritos y cerumen de *T. angustula*, Por el contrario, los aislamientos de este trabajo

tienen cierta similitud respecto a lo presentado por Pérez-Pérez et al. (2013), quienes encontraron principalmente bacterias del género *Bacillus*. Gilliam et al. (1984) y Rosa et al. (2003), encontraron levaduras como *Starmerella meliponinorum*, *Starmerella neotropicalis*, *Candida apicola* y *Zygosaccharomyces* spp.

De todos los aislamientos, especies como *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *L. massiliensis* fueron encontrados también en muestras de polen. Es de esperar que haya microorganismos compartidos por el polen y abejas, dado que son ellas las encargadas de traerlo al nido, procesarlo y distribuirlo. La similitud de la diversidad bacteriana del polen respecto a los tipos de abejas en colonias sanas mostró estar más relacionada con las abejas pecoreadoras (AP) aunque no hubo gran diferencia respecto a las otras abejas (Figura 35 A), tal como lo describe Jones y colaboradores (2018), quienes asocian las diferentes tareas y comportamientos de *A. mellifera* con ciertos grupos de microorganismos. Esta relación cercana del polen con las abejas ha sido estudiada en múltiples ocasiones, asociando el fitness de los individuos de la colonia con los microorganismos ingresados al nido a través del polen (Dharampal et al., 2019; Vásquez et al., 2012), ya que este no solo sirve como fuente nutricional para los adultos, sino que a manera de pan de abeja, sirve como alimento entregado por las nodrizas a las larvas en las celdas de cría (Naiem et al., 1999). Es una fuente de proteínas necesaria para las abejas (Brodschneider & Crailsheim, 2010) lo que lo hace un vehículo importante para la microbiota asociada a él.

En las colonias con presencia del deterioro hay ligeramente mayor similitud entre todas las abejas que con el polen (Figura 35 B). La homogenización de las bacterias encontradas entre las diferentes edades de las abejas en la etapa inicial del deterioro podría deberse a que la microbiota asociada está respondiendo en todas ellas de la misma manera al estímulo que origina el deterioro de la colonia. Por ejemplo Li et al. (2012) encontraron que la infección de *Apis cerana* con *Nosema ceranae* resulta en la disminución de las cantidades de los taxa bacterianos comúnmente encontrados en esta especie de abeja, aunque este efecto de *N. ceranae* no se observa en *A. mellifera* en donde hubo solo cambios ligeros en la composición microbiana en los intestinos de las abejas (Rubanov et al., 2019), lo que mostraría que la respuesta podría estar relacionada con la especie de abeja infectada.

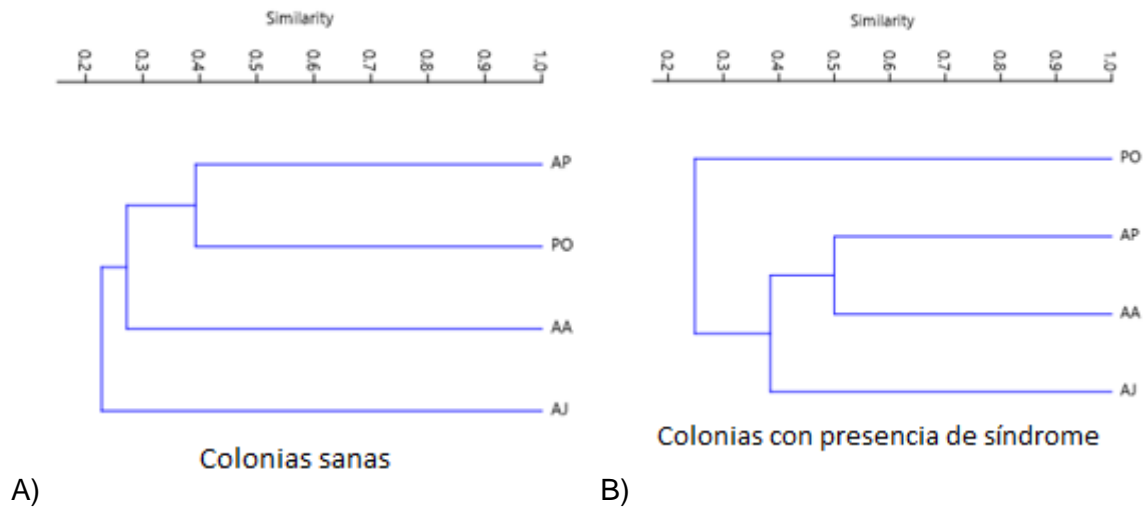


Figura 35 Similitud (Jaccard) de las muestras de polen (PO), abejas pecoreadoras (PO), abejas adultas (AA) y abejas juveniles (AJ) en colonias sanas (A) y en colonias con presencia de deterioro (B)

García-García *et al.* (2006) aislaron bacterias de polen de abejas y potes, además del tracto digestivo de *A. mellifera* y encontraron los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* y *Arthrobacter*. Gilliam *et al.* (1990) encontraron también *B. megaterium*, *B. alvei* y *B. circulans*, Vasquez y Olofsson (2009) identificaron *Lactobacillus* y bacterias de la familia *Pasteurellaceae* también en *A. mellifera*. También se ha establecido que por esta misma vía cualquier tipo de microorganismo patógeno puede ingresar a la colonia cuando las abejas forrajeras visitan una fuente previamente contaminada (Pereira *et al.*, 2019; Voulgari-Kokota *et al.*, 2019) lo que pondría en riesgo la salud del nido.

El pote de polen pasó de tener 11 morfotipos en colonias sanas a 24 en colonias con señales de deterioro. En este caso las bacterias que más destacaron fueron *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* e *I. variabilis* (Figura 36). Este resultado difiere totalmente del obtenido por Pérez-Pérez *et al.* (2013) quienes únicamente aislaron *Staphylococcus* sp. de las muestras de cerumen del pote de polen en la cara interna y ninguno en la cara externa. Esta diferencia podría deberse a la diferencia en la toma de muestra, que no solo varió en cuanto a la metodología del muestreo, sino también el tipo de medio de cultivo

utilizado y el tipo de almacenamiento de la muestra. En este trabajo no se hizo distinción en cuanto a la superficie muestreada del pote.

La abundancia bacteriana no presenta valores tan altos como en otras fuentes en las colonias sanas, pero sí se observa que el recuento de algunas de las especies aumentó en la etapa temprana de deterioro y la etapa tardía, lo que confiere diferencias significativas de la carga bacteriana entre los estados de colonia evaluados. Además de esto, la diversidad encontrada en colonias sanas, etapa temprana y etapa tardía presenta muy poca similitud.

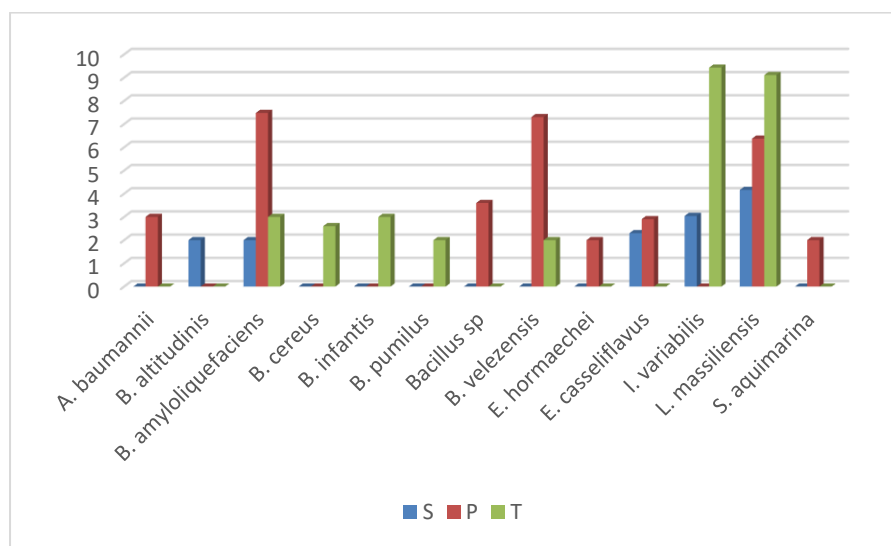


Figura 36 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Pote de Polen en diferentes estados de deterioro (S: sanas, P: etapa temprana, T: etapa tardía)

Al comparar la diversidad encontrada en polen y pote de polen solo compartieron 7 morfotipos de los 20 aislados para estas dos fuentes, lo que les confiere una baja similitud.

3.2.3 Microorganismos aislados de diferentes estructuras de la colmena.

El tercer grupo de muestras a analizar corresponde al componente estructural que incluye todas las muestras de cerumen de diferentes partes de la colmena, como lo son los detritos (B) el involucro (I), los discos de cría joven (DJ) y los discos de cría viejos (DV), la resina (R), la basura o y la piquera (PI). Todas estas muestras, junto con los potes de polen y

miel, tienen en común el estar construidas a partir del cerumen y propóleo, el cual está compuesto por la cera producida en las glándulas abdominales de las abejas y resina de plantas, y del que se conocen propiedades antibacteriales y antifúngicas (Araújo et al., 2016; Campos et al., 2014; Lavinás et al., 2019).

La basura o detritos (D) fue una de las muestras que presentó mayor diversidad bacteriana. De colonias sanas fue posible aislar 16 morfotipos, que incluyen las especies *A. baumannii*, *B. altitudinis*, *B. marisflavi*, *B. velezensis*, *E. casseliflavus* y *L. massiliensis*, mientras que de colonias deterioradas se aislaron *A. baumannii*, *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. marisflavi*, *B. mojavensis*, *B. velezensis*, *Bacillus* sp., *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *I. variabilis*, *L. massiliensis* y *M. paraoxydans*, además de 25 morfotipos más sin identificar. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la abundancia bacteriana de colonias Sanas (S) respecto a colonias de etapa temprana y así mismo la diversidad bacteriana fue disímil entre ellas. Teniendo en cuenta que todos los desperdicios que se extraen de la colonia terminan en las zonas de basura, es de esperarse que las bacterias aisladas de esta fuente se encuentren también en las otras muestras.

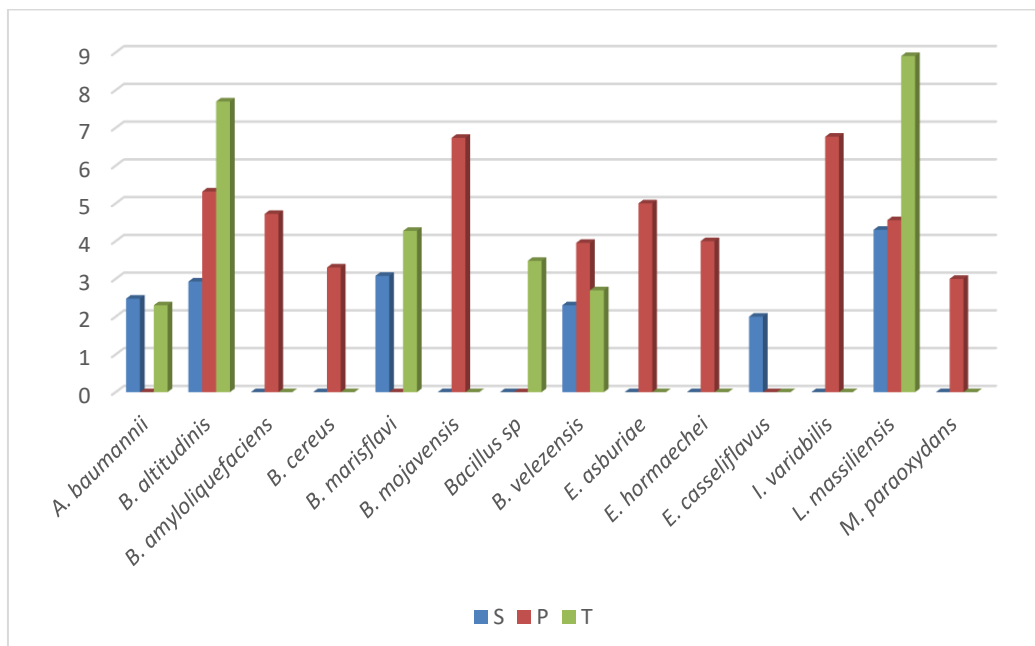


Figura 37 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de detritos (B) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa Temprana, T: Etapa Tardía)

En los discos de cría jóvenes (DJ), es decir discos del frente de avance contruidos poco tiempo antes de los muestreos y que almacenan huevos o larvas en los primeros estadios, se aislaron seis morfotipos de colonias sanas de las cuales cuatro de las especies bacterianas fueron identificadas (*B. siamensis*, *E. casseliflavus*, *L. massiliensis* y *L. sphaericus* (Figura 38), mientras que aquellas colonias con presencia del deterioro, 18 morfotipos fueron aislados y nueve identificados. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la abundancia bacteriana de colonias sanas y colonias con presencia del deterioro, siendo considerablemente más abundante en estas últimas, y el índice de Jaccard arrojó valores bajos de similitud entre colonias sanas y con presencia del deterioro, siendo ligeramente más similares los DJ de las colonias sanas con respecto a los de las colonias en la etapa temprana de deterioro.

El efecto de los microorganismos sobre el hospedero ha sido ampliamente documentado desde el punto de vista de la presencia de un patógeno como por ejemplo *Ascosphaera apis*, *N. apis* o *N. ceranae*, que causan deterioro en el vuelo, inicio precoz en la búsqueda del alimento, reducción en los períodos de trofalaxis y otros en *Apis* y *Bombus* (Gomez-Moracho et al., 2017) u hongos como *Massospora* sp o *Ophiocordyceps unilateralis*, los cuales manipulan a hormigas o cigarras para poder dispersarse a un nuevo hospedero (Cooley et al., 2018; Hughes et al., 2011). También los simbioses asociados y los cambios que ellos puedan sufrir en los hospederos, influyen en el comportamiento de estos últimos como en el caso de *D. melanogaster*, cuyos simbioses modifican el olfato de las moscas y por ende las decisiones de forrajeo (Wong et al., 2017). De esta manera, las muestras de disco joven engrosado (DJ eng) podrían estar sugiriendo un incremento en la actividad de las obreras encargadas de la formación del opérculo a manera de cambio en su comportamiento.

Dichos DJ eng no presentaron similitud en la diversidad bacteriana respecto al DJ de colonias sanas y las muestras de DJ de colonias con presencia del deterioro, lo que lleva a buscar la razón por la cual el engrosamiento del cerumen del opérculo tiene una reducción importante en la diversidad y abundancia bacteriana alojada en ellos. Se podría sugerir que el cerumen engrosado podría haber sufrido algún cambio lo que conlleva a que deje de ser un medio óptimo para el crecimiento bacteriano, para lo cual se deberían hacer más estudios al respecto.

Los discos de cría viejos (DV), es decir en los que las larvas se encuentran en último estadio o ya están en estado de pupa (Figura 39), muestran diferencias significativas ($P < 0.05$) en la abundancia y la diversidad bacteriana entre colonias sanas y colonias en etapa temprana de deterioro. Al igual que en todas las muestras analizadas anteriormente, se observa en los discos de crías la aparición de *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *I. variabilis* y *L. massiliensis*. En el disco de cría viejo con engrosamiento se encontró una alta cantidad de *B. amyloliquefaciens*.

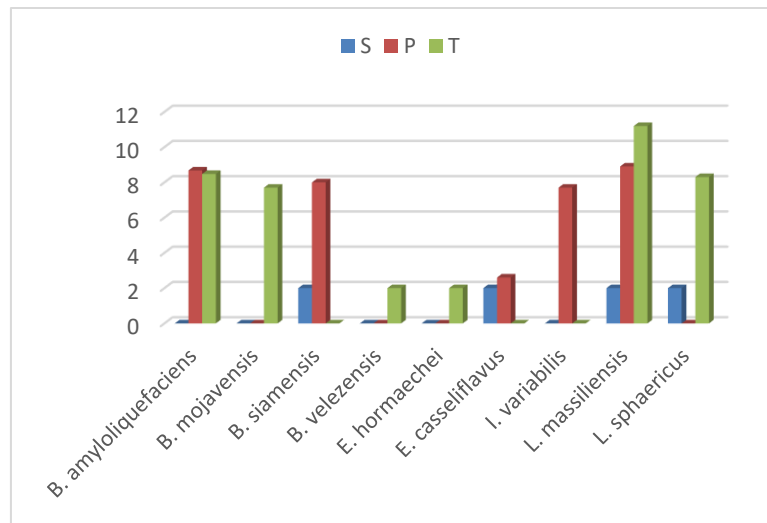


Figura 38 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de disco joven (DJ) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)

No se encontraron diferencias significativas al comparar la abundancia bacteriana en DJ y DV de colonias sanas, etapa temprana o etapa tardía, siendo consistente con el comportamiento de los recuentos bacterianos en todas las muestras respecto al avance del deterioro. En cuanto a la diversidad por etapa de deterioro entre DJ y DV los valores de similitud para todas las etapas de deterioro fueron bajos.

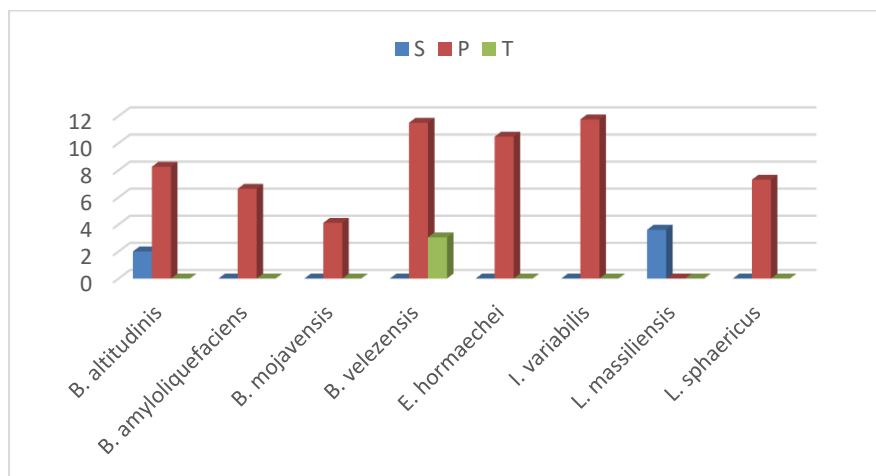


Figura 39 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de disco viejo (DV) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)

El involucro (I) fue la fuente estructural que mostró una diversidad mayor de bacterias en las colonias sin presencia de deterioro dentro de las que se cuentan *A. baumannii*, *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. infantis*, *B. mojavensis*, *B. velezensis* y *L. massiliensis*. A diferencia de otras fuentes, el involucro no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la abundancia de las bacterias aisladas al comparar todos los estados de deterioro, con excepción de *B. mojavensis* (Figura 40), pero se encontró poca similitud en las especies encontradas al comparar las colonias sanas y las diferentes etapas de deterioro.

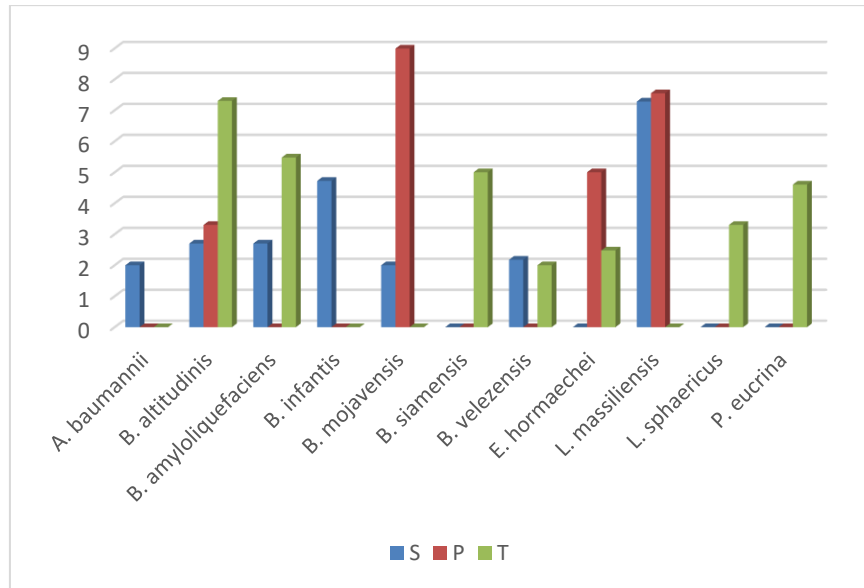


Figura 40 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de involucro (I) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)

En la resina (R) de colonias sanas se aislaron únicamente cinco morfotipos, y respecto a la resina de colonias en etapa temprana del deterioro, se observa muy poca similitud de la diversidad de especies entre etapas de deterioro. En cuanto a la abundancia bacteriana por estado se encontraron diferencias significativas, destacando la aparición de *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. pumilus* y *B. siamensis*, especies bacterianas aisladas también de las otras fuentes.

La resina en particular es un elemento colectado por las abejas de las plantas disponibles en el ecosistema, para utilizarla en la construcción de las estructuras como potes, discos, involucro y piquera, para impermeabilizar el nido y como protección física contra invasores como hormigas, además de hacer uso de sus propiedades antimicrobianas (Langenheim, 2003; Leonhardt & Blüthgen, 2016), antifúngicas y antivirales (Ghisalberti, 1979; Lokvam & Braddock, 1999). Este elemento es usado no solo por las abejas, sino también por algunas hormigas como mecanismo de control de microorganismos en el nido (Christe et al., 2003), como fuente de terpenos para repeler depredadores en larvas del himenóptero *Neodiprion sertifer* (Eisner, 1974), o como material de construcción de nidos por parte de hormigas del género *Vollenhovia* (Brühl, 2003).

Dado que la resina posee cualidades antimicrobiales (Langenheim, 2003; Savoia, 2012; Shuaib et al., 2013), al igual que las estructuras fabricadas con ella (Araújo et al., 2016; Campos et al., 2014; Fratini et al., 2016; Lavinias et al., 2019 Salas, 2018), y que además no se tiene mucho conocimiento respecto al comportamiento higiénico de las abejas sin aguijón al presentarse muerte causada por alguna enfermedad sino solo por experimentos donde es el investigador quien mata las larvas (Nunes-Silva et al., 2009), se podría pensar que incrementando el grosor del opérculo de las celdas de cría, las abejas podrían estar intentando frenar alguna fuente de patógenos que se encuentre allí alojada. Es necesario realizar más estudios para poder confirmar esta hipótesis.

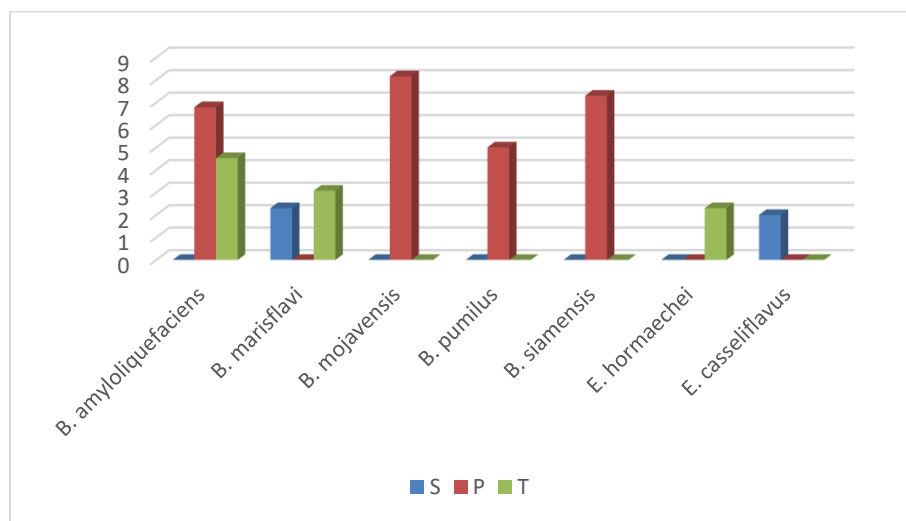


Figura 41 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de Resina en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)

De la piquera (PI) de colonias sanas fueron aislados nueve morfotipos dentro de los cuales se identificaron *B. marisflavi*, *B. velezensis*, *A. calcoaceticus* y *A. baumanii*, mientras que de las colonias con algún nivel de deterioro fueron aislados 25 morfotipos dentro de los cuales se identificaron *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. velezensis*, *I. variabilis*, *L. massiliensis* y *M. paraoxidans*. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar la abundancia de microorganismos en los diferentes estados de deterioro ni tampoco se registró similitud entre la diversidad encontrada en ellos. La única especie que se mantuvo en colonias sanas y colonias con presencia del deterioro fue *B. velezensis* (Figura 42).

Salas (2018) encontró 28 morfotipos bacterianos en piqueras de *T. angustula* y *Friesomelita paupera*, de los cuales se identificaron en común *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecium*. En los metabolitos secundarios obtenidos por los autores de los aislamientos, encontraron actividad inhibitoria frente a uno o más de los entomopatógenos *Purpureocillium lilacilum*, *Bauveria basiana*, *Bacillus thuringiensis* y *Serratia marcescens*. Así mismo los extractos preparados a partir de las piqueras muestreadas y de algunas de las cepas aisladas, presentaron potencial inhibitorio contra *Metarhizium* sp. En concordancia con lo reportado por esos autores, en este estudio se aislaron de todas las colonias en diferentes estados de deterioro, bacterias que, de acuerdo con la literatura, poseen potencial inhibitorio contra otros microorganismos. En colonias sanas fue aislado *B. velezensis*, el cual produce metabolitos que inhiben el crecimiento de hongos, pero las otras tres bacterias aisladas, hasta el momento no se conoce actividad antibacteriana o antifúngica. Por el contrario, en colonias con presencia del deterioro se detectó un mayor número de cepas conocidas por su actividad antimicrobiana como lo son *B. altitudinis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *I. variabilis*, *L. massiliensis* y *M. paraoxydans*.

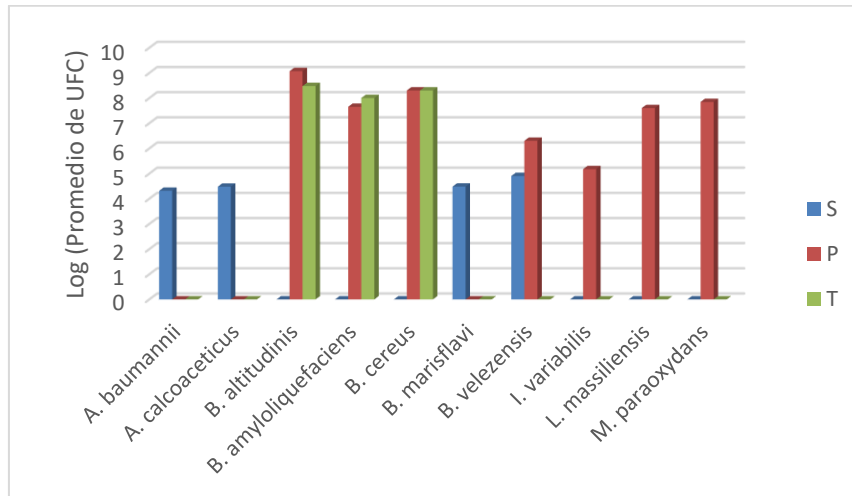


Figura 42 Comparación de las abundancias (UFC) por especie aislada de la piquera (PI) en diferentes estados de deterioro (S: Sanas, P: Etapa temprana, T: Etapa Tardía)

Salas (2018) sugiere que uno de los mecanismos de defensa de la colonia sería la presencia de microorganismos productores de metabolitos secundarios que bloqueen la entrada de ciertos patógenos. Si se analizan los resultados obtenidos en este estudio bajo esa premisa, podríamos pensar que hay algún elemento externo que estimula el aumento

de los microorganismos con propiedades antimicrobianas, no solo en la piquera, sino en las otras muestras analizadas.

Podríamos incluso llegar a suponer que lo anterior estaría relacionado a la capacidad que tienen las abejas de intercambiar microorganismos con otras abejas por intermedio de las heces para alcanzar los niveles bacteriológicos óptimos para la salud de la colonia (Koch & Schmid-Hempel, 2011b). Bien se conoce que las abejas tienen la capacidad de inocular microorganismos en el polen que le permite mantener sus propiedades y calidad (Gilliam, 1979) así que no sería extraño pensar que este tipo de intercambio de microbiota también la realicen con las diversas estructuras y materiales del nido a modo de mecanismo de defensa en caso de presentarse algún patógeno. Este comportamiento explicaría el aumento en la distribución de algunos de nuestros microorganismos por toda la colonia especialmente en el primer estado de deterioro.

3.3 Microorganismos aislados de muestras asociadas a señales del deterioro

De las muestras especiales con alguna relación con características del deterioro (sustancia blanca húmeda [CBH], sustancia blanca seca [CBS], celda no desarrollada [CND], celda con opérculo raro [COR], disco joven engrosado [DJ eng], larva muerta [LM] y larva vecina [LV]) se aislaron un total de 20 bacterias de las cuales 12 fueron identificadas a especie.

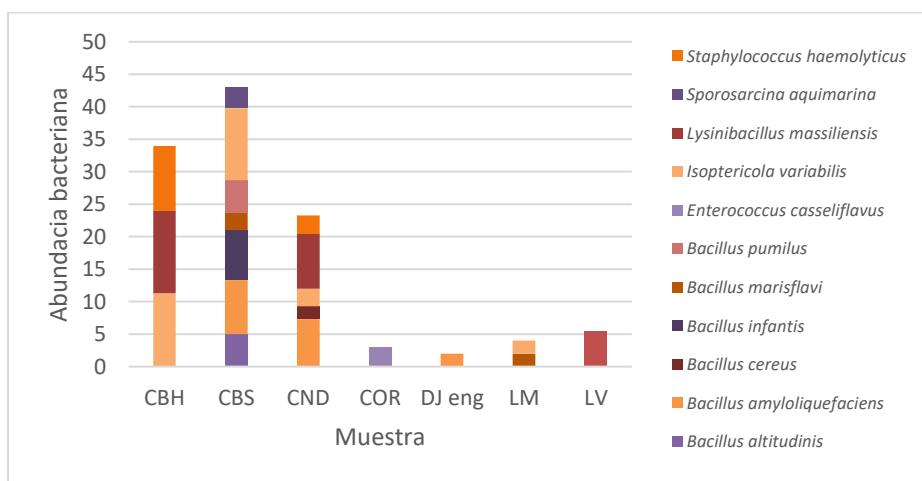


Figura 43 Diversidad y abundancia bacteriana en las muestras relacionadas con características del deterioro sustancia blanca húmeda [CBH], sustancia blanca seca [CBS], celda no desarrollada [CND], celda con opérculo raro [COR], disco joven engrosado [DJ eng], larva muerta [LM] y larva vecina [LV]

La diversidad de especies fue mayor en CBS al igual que la abundancia de las mismas (Figura 43), principalmente porque este tipo de muestra fue encontrado en colonias en etapa temprana de deterioro, esto último equivalente a lo observado en todas las muestras evaluadas. *I. variabilis* y *B. amyloliquefaciens* fueron las especies que se aislaron con más frecuencia de este tipo de muestras, continuando con la prevalencia de la segunda que ha sido observada previamente. Dado que no se encontró una bacteria repetitiva a lo largo de las muestras, situación que podría haber sugerido dicha bacteria como patógeno, no podemos asegurar que haya un patógeno que cause este tipo de muestras especiales, contrario, por ejemplo, a lo que se observa en colonias de *A. mellifera* infectadas con loque americana en las que se observan larvas de contextura viscosa de las que es posible aislar la bacteria patógena formadora de esporas (De Graaf et al., 2006).

Tal como lo indican Jurat-Fuentes y Jackson (2012) se dificulta el aislamiento y la identificación de bacterias causantes de enfermedades, pues depende del medio que se les provee y las exigencias nutricionales de cada cepa. En el caso del presente estudio, nos limitamos a trabajar con bacterias que crecieran en agar nutritivo en condiciones oxigénicas, pero para poder identificar todos los microorganismos asociados a las diferentes etapas de deterioro sería ideal trabajar con técnicas moleculares como lo sugieren Ellegaard y Engel (2016).

3.4 Características de los grupos bacterianos más comunes en las muestras

Bacilliales

El género *Bacillus* es muy conocido por producir gran cantidad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales se explotan de manera industrial (Chaabouni et al., 2012; Sansinenea & Ortiz, 2011). Al analizar las muestras, las especies de este género encontradas a lo largo de todas las muestras presentaron cambios en su abundancia ya fuera de reducción o incremento (Tabla 7). Por ejemplo, *B. infantis*, presente en abejas,

inmaduros y miel en las colonias sanas, desapareció o se redujo de manera drástica en las colonias con señales de deterioro, mientras que *B. velezensis* y *B. mojavensis* les ocurrió lo contrario al estar presentes inicialmente en solo algunas de las fuentes de colonias sanas. Al comparar estas dos especies en colonias sanas y colonias con presencia del deterioro, se encontró que para las primeras 9 fuentes tenían presencia de estas bacterias, mientras que en las segundas se detectaron estas dos especies en 14 fuentes.

Tabla 7 Variación (%) de las abundancias de las especies de *Bacillus* aisladas de las diferentes fuentes. Las celdas están coloreadas de acuerdo con el porcentaje de cambio de las abundancias bacterianas al comparar entre fuentes de colonias sanas y colonias con presencia del deterioro progresivo según la escala de colores. Las bacterias que desaparecen se muestran en color rojo, aquellas que presentaron ningún o poco cambio en amarillo y aquellas que sufrieron un gran incremento de abundancia en verde. Las celdas con estrella corresponden a especies que fueron aisladas de muestras con presencia de deterioro pero que estaban ausentes en las colonias sanas (abeja adulta [AA], abeja juvenil [AJ], abeja pecoreadora [AP], detritos [B], disco joven [DJ], disco viejo [DV], involucro [I], intestino de adulta [IA], intestino de juvenil [IJ], intestino de pecoreadora [IP], larva [L], miel [M], piquera [PI], pote de miel [PM], polen [PO], pote de polen [PP], resina [R]).

<i>Bacillus</i>	AA	AJ	AP	B	DJ	DV	I	IA	IJ	IP	L	M	PI	PM	PO	PP	R
<i>altitudinis</i>													★	★	★		
<i>amyloliquefaciens</i>				★	★	★							★	★			
<i>aryabhatai</i>												★	★				
<i>cereus</i>				★								★	★			★	
<i>infantis</i>													★			★	
<i>marisflavi</i>											★				★		
<i>megaterium</i>												★					
<i>mojavensis</i>		★		★	★	★						★	★		★		★
<i>pumilus</i>								★				★		★		★	★
<i>siamensis</i>	★						★				★		★		★		★
<i>Bacillus sp</i>				★						★		★	★		★	★	
<i>velezensis</i>			★		★	★			★			★		★		★	

Dos de las especies de *Bacillus* que se destacaron en los muestreos de etapa temprana fueron *B. altitudinis* y *B. amyloliquefaciens*, no solo por haber tenido un aumento en su abundancia en las fuentes donde ya se encontraban en las colonias saludables, sino que también se extendió ampliamente su presencia a fuentes en las cuales no fue detectada en colonias sanas (Tabla 7). Aunque *B. altitudinis* fue reportado como patógeno de peras y manzanas (Elbanna et al., 2014), no ha sido descrito hasta el momento como patógeno de insectos. Por el contrario ha presentado actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias

como *P. aeruginosa*, *E. coli* (Hwang et al., 2016), *Streptomyces scabies* (B. Li et al., 2019), el oomiceto *Phytophthora sojae* (Lu et al., 2017) y una gran variedad de hongos como *Magnaporthe oryzae* (Xi-Biao et al., 2012) *Colletotrichum gloeosporoides*, *Corynespora cassicola*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* sp. *Pisi* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Goswami & Deka, 2019). En cuanto a *B. amyloliquefaciens*, se ha descrito como fuente de múltiples metabolitos secundarios y antibióticos (Arguelles-Arias et al., 2009) con los cuales puede inhibir el crecimiento de bacterias como *Burkholderia pseudomallei* (Boottanun et al., 2017) u hongos como *Trichoderma harzianum* (Caldeira et al., 2007), *Fusarium* sp. (Dunlap et al., 2013) o *Rhizoctonia solani* (Srivastava et al., 2016) entre otros (Ji et al., 2013), en su mayoría relacionados con fitopatógenos. Una de las características interesantes de esta especie es que tiene la capacidad de activar las defensas de las plantas, al estar en presencia de bacterias invasoras (Tan et al., 2013), pero se desconoce si podría estar induciendo alguna respuesta en un hospedero animal o incluso en otras bacterias.

Por otro lado también el incremento de algunas enterobacterias y actinobacterias llama la atención, ya que coincidiendo con los *Bacillus*, presentan actividad antibacterial y antifúngica (Hussein et al., 2018; Nafis et al., 2018).

Enterobacterias

Enterobacter y **Shigella** también presentan un aumento en sus abundancias. Si bien estos dos géneros están genéticamente relacionados (Cilia et al., 1996; Garcia-Martinez et al., 1996; Anton et al., 1998, 1999; Martinez-Murcia et al., 1999) las bacterias del género *Shigella* son más conocidas por ser patógeno intracelular de humanos, mientras que por el contrario se ha demostrado la producción de metabolitos que inhiben hongos y levaduras por parte de algunas especies de *Enterobacter* (Chernin et al., 1996; Hameed et al., 2018; Kerr, 1999; Marchi & Utkhede, 1994), inclusive en el intestino humano (Sovran et al., 2018). Este tipo de respuesta de la microbiota podría ser uno de los mecanismos de defensa, en la que los microorganismos simbioses colonizan nichos del hospedero y así evitan que sean invadidos por un patógeno causante de una infección (Kaltenpoth & Engl, 2013), o una respuesta a cambios fisiológicos en las colonias debido al deterioro, que posiblemente

incrementen recursos nutricionales que permiten una mayor y más acelerada división celular de algunas bacterias. Por ejemplo, se ha sugerido que el encontrar una mayor abundancia de Gamaproteobacterias puede estar indicando cambios fisiológicos derivados de la presencia del desorden de colapso de colonia dentro de las colmenas de *A. mellifera* (Cox-Foster et al., 2007).

En el caso de este estudio, el incremento en la abundancia de bacilos y enterobacterias a partir de la etapa temprana del deterioro de las colonias podría estar reflejando una respuesta de la microbiota asociada a *T. angustula* en las colonias evaluadas ante la presencia de un patógeno no detectado por medio de la metodología utilizada, y dado que no se encontró evidencia que pueda sugerir la presencia de un patógeno bacteriano, y dada la propiedad antifúngica de los aislados, podríamos tener una pista respecto al causante del deterioro. Se tiene registro de muerte de colonias de abejas sin aguijón causada por el hongo *N. ceranae* (Grupe & Quandt, 2020; Porrini et al., 2017), lo que demostraría la vulnerabilidad de las abejas ante este tipo de patógenos. En este caso previo al inicio de esta investigación se descartó por medios moleculares la presencia de hongos de ese género en las colonias deterioradas (Rosso com. Pers 2015) pero no se ha realizado un muestreo enfocado en este tipo de organismos.

Wei et al. (2017) encontraron que en *Anopheles gambiae* la infección tóxica con *B. bassiana* causa una disbiosis en el mosquito al permitir el crecimiento de la bacteria patógena oportunista *Serratia marcescens*, que facilita la acción letal del hongo. Teniendo en cuenta la variación de la abundancia bacteriana, no solo en las muestras de abejas sino en toda la colmena y de la actividad antifúngica de algunos de los aislamientos, podríamos pensar que existe la presencia de un hongo patógeno causante de una disbiosis y del deterioro de la colonia. Esta interacción hongo-bacteria no es desconocida debido a que puede ser benéfica o perjudicial para las actividades del hombre y no es dependiente a ser transmitido de madre a cría, sino que está más relacionada con los factores ambientales (Lewis & Lizé, 2015). El encuentro de hongo y bacteria da inicio a la interacción entre estos organismos, permitiendo la modulación de uno o los dos integrantes dependiendo de las características de cada uno de ellos, lo que determina el grado de acción recíproca (Deveau et al., 2018) y su correspondiente efecto en el hospedero.

3.5 Variación de abundancias bacterianas en el tiempo.

Los muestreos realizados a las colonias en su mayoría solo corresponden al estado en el que se encontraban en ese momento, a manera de “fotografía” en el tiempo. Si se quisiera observar con mayor claridad cambios en la microbiota al ir avanzando el progreso del deterioro, estos serían más evidentes al realizar muestreos consecutivos en colonias con y sin señales de deterioro, como los dos realizados por Motta et al. (2018) para determinar el efecto del glifosato sobre la microbiota intestinal de *A. mellifera* o los datos colectados por Hroncova et al. (2015) durante 16 muestreos en los que colectaron diferentes estados de desarrollo de abejas e identificaron los microorganismos asociados para establecer el efecto de las zonas de colecta y el estado ontogenético sobre la diversidad microbiológica.

Cuatro de las colonias con presencia del deterioro fueron muestreadas en dos fechas diferentes; Tres de las colonias (E26, E50 y L75) permanecieron categorizadas bajo el mismo nivel de deterioro, y solo una (L73) fue clasificada en un nivel de deterioro mayor al encontrado en el primer muestreo. A pesar de la aparente estabilidad en el deterioro de las colonias, se observó en todos los casos un cambio en las abundancias de las bacterias identificadas (Figura) que podría sugerir una tendencia a la reducción de microorganismos comunes como los bacilos y dar pie a la aparición de nuevas bacterias que antes no se encontraron presentes, principalmente en las primeras etapas del deterioro.

El comportamiento de los microorganismos frente a un agente extraño puede ser positivo al aumentar el número de células para atacar al patógeno o negativo al perderse microorganismos importantes para la nutrición y defensa del hospedero (Cariveau et al., 2014; Dillon et al., 2005; Koch & Schmid-Hempel, 2011b; Praet et al., 2018)

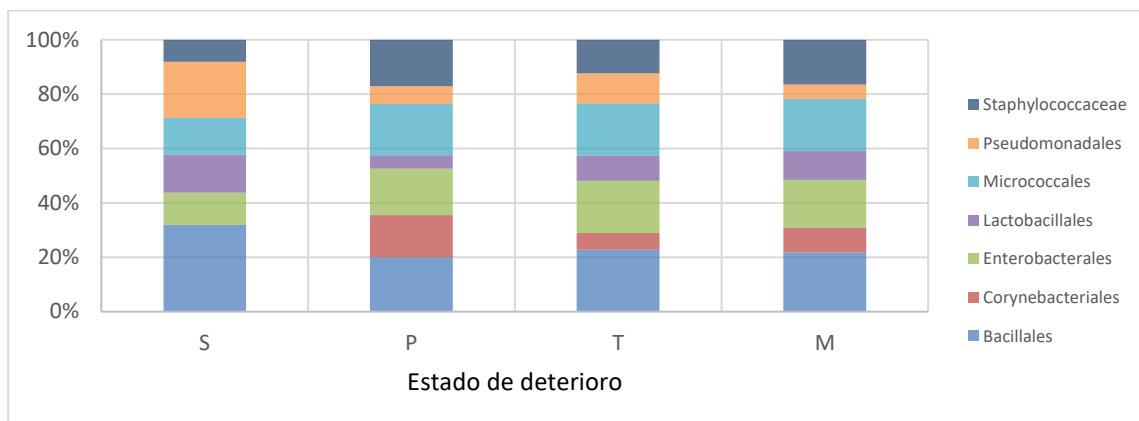


Figura 44 Abundancia relativa de las bacterias identificadas en los estados de deterioro (S=Sanas, P=Etapa temprana, T=Etapa tardía y M=Muerte).

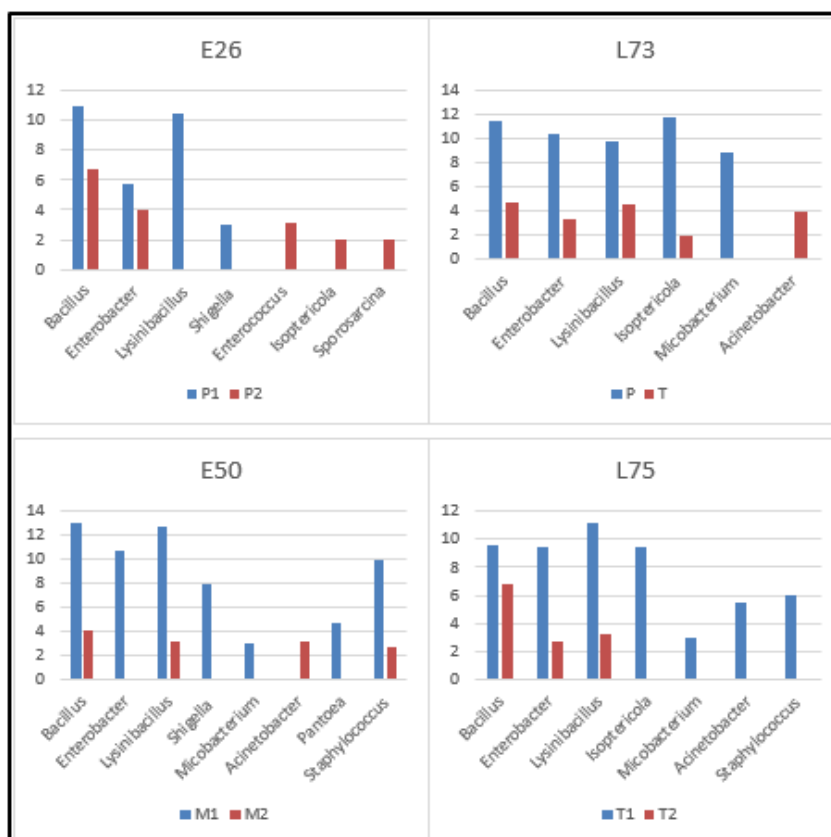


Figura 45 Abundancias relativas de bacterias aisladas de la misma colonia, en dos muestreos diferentes. Las barras azules corresponden al primer muestreo y las rojas al segundo (P=Etapa temprana, T=Etapa tardía)

Sería posible pensar que esta tendencia podría estar ligada a una dinámica natural de los microorganismos de *T. angustula*, como la observada en el análisis realizado por Kesnerová et al. (2019) para *A. mellifera*, en el que se observó un cambio en el microbioma del intestino de las abejas en diferentes estaciones. En ese estudio no se reporta desaparición total de algunos grupos bacterianos como si ocurre en las muestras analizadas en esta oportunidad, por lo cual se hace necesario obtener más evidencia para comprender con mayor claridad la dinámica de las bacterias en los diferentes estados de deterioro.

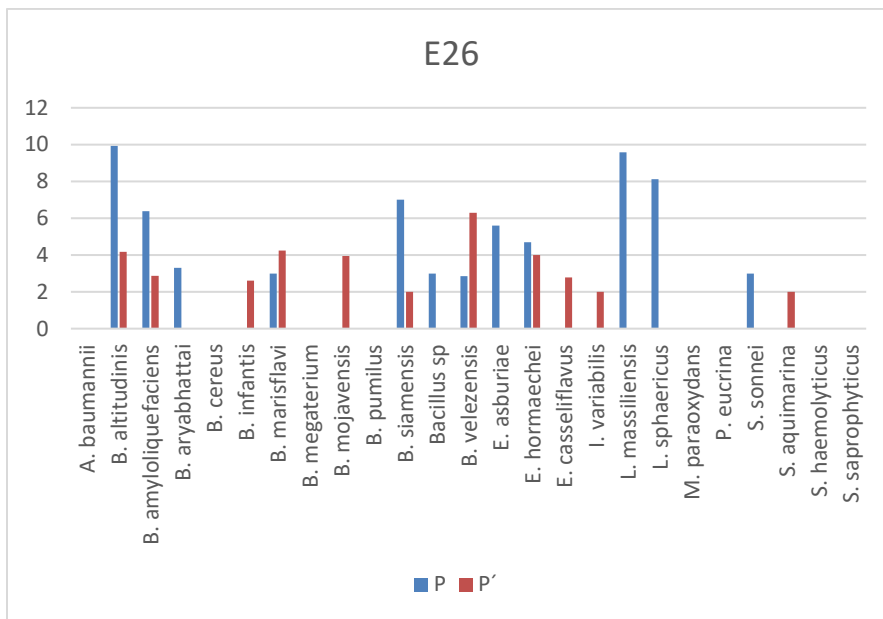


Figura 46 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonia E26 muestreada dos veces en el tiempo

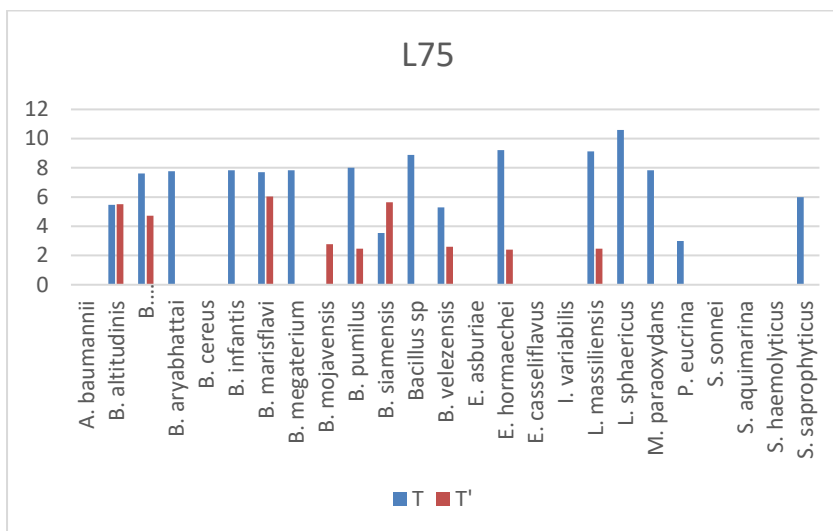


Figura 47 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonia L75 muestreada dos veces en el tiempo

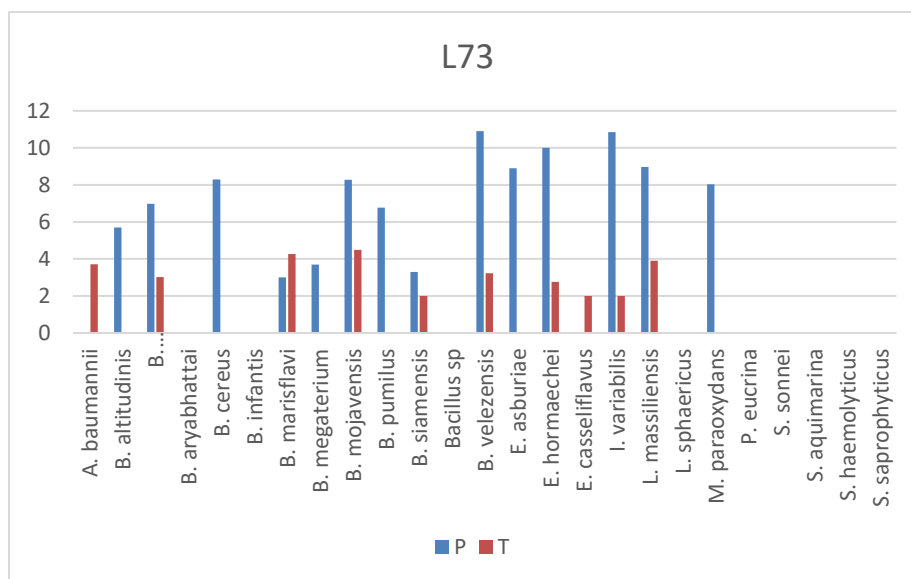


Figura 48 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonias L73 muestreada dos veces en el tiempo

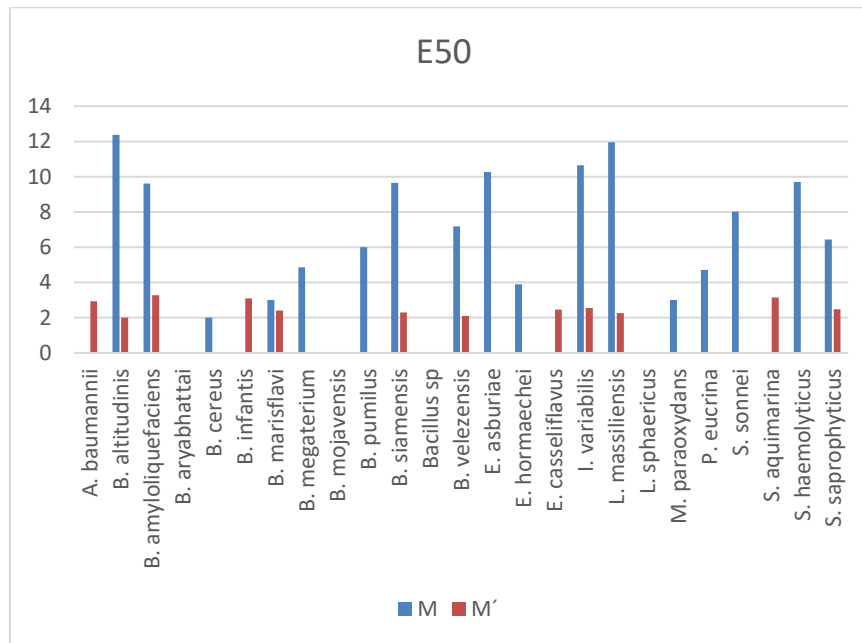


Figura 49 Cambio en la abundancia relativa (UFC) de bacterias por especie en colonia E50 muestreada dos veces en el tiempo

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Se reporta un listado de microorganismos asociados a larvas, pupas y adultos de colonias sanas de *Tetragonisca angustula* aportando así al conocimiento de la especie.
- Se reporta un listado de microorganismos asociados a miel, involucro, resina, discos de cría, polen y entrada (piquera) como complemento a los reportados en otros estudios.
- Encontramos que la presencia del deterioro en las colonias de *T. angustula* muestreadas en la Hacienda Agroecológica el Paraíso tiene relación con una mayor diversidad y abundancia de especies bacterianas especialmente del género *Bacillus* al encontrarse ampliamente representada en todos los tipos de muestras de este trabajo (nido y abejas).
- A pesar de que los análisis no mostraron ningún patrón en particular en las muestras aisladas se encontró la presencia de microorganismos conocidos como posibles patógenos en insectos, aunque no hay evidencia que indique que sean los causantes del deterioro de colonias de *T. angustula* reportado.
- La presencia de muestras como las sustancias blancas húmeda y seca podría estar sugiriendo la presencia de un patógeno que no pudo ser aislado por métodos convencionales.
- Con la información colectada en este estudio no hay suficiente evidencia para asegurar que es la variación de la microbiota (disbiosis) la causante del deterioro o si los cambios en la microbiota podrían estar asociados al estímulo por parte de la presencia de un microorganismo no convencional en las colonias
- Si bien no se pudo determinar el agente causante de las manifestaciones de deterioro en las colonias, se pudo determinar que los microorganismos que presentaron mayor abundancia en la etapa temprana de deterioro han sido reportados en la literatura como productores de metabolitos antibióticos y antifúngicos que podrían estar apuntando a una respuesta ante la presencia del patógeno.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar un análisis por métodos moleculares o el uso de medios de cultivo más específicos para descartar la presencia de algún microorganismo no cultivable o intracelular que pudiera estar causando el deterioro.
- Para obtener una mayor claridad en cuanto a la dinámica de los microorganismos en condiciones sanas y con presencia de la señales de deterioro a través del tiempo, sería ideal realizar muestreos consecutivos a las colonias, aislar identificar y cuantificar las bacterias para poder realizar un contraste más específico de la dinámica de los microorganismos a medida que avanza el deterioro de la colonia.
- Es necesario evaluar la patogenicidad de *S. aureus* y *L. sphaericus* para descartar o relacionar su presencia con el deterioro
- Sería pertinente analizar las muestras para evaluar si es un hongo o si hay una interacción hongo-bacteria que sea causante del deterioro

5. Bibliografía

- Abraham, J., & Silambarasan, S. (2015). Plant Growth Promoting Bacteria Enterobacter asburiae JAS5 and Enterobacter cloacae JAS7 in Mineralization of Endosulfan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7), 3336–3348. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1504-7>
- Acosta-Saraiva, M., Pegoraro-Zemolin, A. P., Franco, J. L., Tomazzoni-Boldo, J., Stefenon, V. M., Triplett, E. W., DeOliveira-Camargo, F. A., & Wurdig-Roesch, L. F. (2015). Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 921–933. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0384-8>
- Adams, A. S., Aylward, F. O., Adams, S. M., Erbilgin, N., Aukema, B. H., Currie, C. R., Suen, G., & Raffa, K. F. (2013). Mountain pine beetles colonizing historical and naive host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes

- contributing to terpene metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3468–3475. <https://doi.org/10.1128/AEM.00068-13>
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>
- Ahn, K., Xie, X., Riddle, J., Pettis, J. S., & Huang, Z. Y. (2012). Effects of long distance transportation on honey bee physiology. *Psyche (New York)*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/193029>
- Akayli, T., Albayrak, G., Ürkü, Çanak, Ö., & Yörük, E. (2016). Characterization of *Micrococcus luteus* and *Bacillus marisflavi* recovered from common dentex (*Dentex dentex*) larviculture system. *Mediterranean Marine Science*, 17(1), 163–169. <https://doi.org/10.12681/mms.1322>
- Akayli, Tülay, Ürkü, Ç., Yardimci, R. E., Çanak, Ö., Sinarit, K., & Enfeksiyon, L. B. B. (2019). *Bacterial Infection in Cultured Common Dentex (Dentex dentex , L . 1758)*. 2(1), 132–138.
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., & Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 22). <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7870-4>
- Alippi, A. M., & Reynaldi, F. J. (2006). Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(3), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.12.002>
- Amaya Márquez, M. (2009). Memoria y aprendizaje en la escogencia floral de las abejas. *Acta Biologica Colombiana*, 14(2), 125–136.
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3), 165–189. <https://doi.org/10.1023/A:1006456720416>
- Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P. W., 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).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125>
- Araújo, M. J. A. M., Bosco, S. de M. G., & Sforcin, J. M. (2016). Pythium insidiosum: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 863–869. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.008>
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., & Fickers, P. (2009). Bacillus amyloliquefaciens GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Arias, M. C., Brito, R. M., De Oliveira Francisco, F., Moretto, G., Freitas De Oliveira, F., Silvestre, D., & Sheppard, W. S. (2006). Molecular markers as a tool for population and evolutionary studies of stingless bees. *Apidologie*, 37, 259–274. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Austin, B., & Austin, D. (2016). *Bacterial fish pathogens* (6th ed.). Springer.
- Bachate, S. P., Nandre, V. S., Ghatpande, N. S., & Kodam, K. M. (2013). Simultaneous reduction of Cr(VI) and oxidation of As(III) by Bacillus firmus TE7 isolated from tannery effluent. *Chemosphere*, 90(8), 2273–2278. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.081>
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2002). Endophytic and biological control potential of Bacillus mojavensis and related species. *Biological Control*, 23(3), 274–284. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1016>
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2011). In planta reduction of maize seedling stalk lesions by the bacterial endophyte bacillus mojavensis. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(6), 485–492. <https://doi.org/10.1139/w11-031>
- Bakalidou, A., Kämpfer, P., Berchtold, M., Kuhnigk, T., Wenzel, M., & König, H. (2002). Cellulosimicrobium variabile sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite Mastotermes darwiniensis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(January), 1185–1192. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.01904-0.Abbreviations>
- Baquero, L., & Stamatti, G. (2007). Cria y manejo de abejas sin aguijon. In *Ediciones del Subtrópico*.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Nathalie Gaveau-Vaillant, C. J., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & P. van Wezeld, G. (2016). Taxonomy, Physiology ,

- and Natural Products of Actinobacteria. *American Society for Microbiology*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.Address
- Barroso, E., & Betioli, E. P. (2005). Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Journal of Apicultural Research*, 44(August), 101–105. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101157>
- Bassler, B., & Vogel, J. (2013). Bacterial regulatory mechanisms: The gene and beyond. *Current Opinion in Microbiology*, 16(2), 109–111. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.04.001>
- Baumann, P. (2005). Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 155–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>
- Belur, P. D., Goud, R., & Goudar, D. C. (2012). Optimization of culture medium for novel cell-associated tannase production from *Bacillus massiliensis* using response surface methodology. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 199–206. <https://doi.org/10.4014/jmb.1106.06004>
- Ben-Yakir, D. (1987). Growth retardation of *Rhodnius prolixus* symbionts by immunizing host against *Nocardia (Rhodococcus) rhodnii*. *Journal of Insect Physiology*, 33(6), 379–383. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90015-1)
- Bonilla-Rosso, G., & Engel, P. (2018). Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.12.009>
- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J. G., & Sermswan, R. W. (2017). Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0302-0>
- Bottacini, F., Milani, C., Turrone, F., Sánchez, B., Foroni, E., Duranti, S., Serafini, F., Viappiani, A., Strati, F., Ferrarini, A., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Fitzgerald, G. F., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2012). *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 Genome Analysis Reveals Clues for Colonization of the Insect Gut. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044229>
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>

- Branco, M. R., Kidd, N. a. C., & Pickard, R. S. (2006). Brazilian propolis of *T. angustula* and *A. mellifera*. *Apidologie*, *37*, 398–407. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Brenner, D. J., McWhorter, A. C., Kai, A., Steigerwalt, A. G., & Farmer, J. J. (1986). *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov., and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, *23*(6), 1114–1120.
- Breznak, J. A. (1982). Intestinal Microbiota of Termites and other Xylophagous Insects. *Annual Review of Microbiology*, *36*(1), 323–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.36.100182.001543>
- Brodtschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, *41*(3), 278–294. <https://doi.org/10.1051/apido/2010012>
- Brown, K., Olendraite, I., & Firth, A. (2019). Identification of viral transcripts in RNA-seq datasets from bees, ants, wasps and mites. *Access Microbiology*, *1*(1A). <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0087>
- Buczolits, S., Schumann, P., Valens, M., Rosselló-Mora, R., & Busse, H. J. (2008). Identification of a bacterial strain isolated from the liver of a laboratory mouse as *Microbacterium paraoxydans* and emended description of the species *Microbacterium paraoxydans* Laffineur et al 2003. *Indian Journal of Microbiology*, *48*(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0035-0>
- Caldeira, A. T., Feio, S. S., Arteiro, J. M. S., Coelho, A. V., & Roseiro, J. C. (2007). Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. *Journal of Applied Microbiology*, *104*(3), 808–816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03601.x>
- Cambroner-Heinrichs, J. C., Matarrita-Carranza, B., Murillo-Cruz, C., Araya-Valverde, E., Chavarría, M., & Pinto-Tomás, A. A. (2019). Phylogenetic analyses of antibiotic-producing *Streptomyces* sp. isolates obtained from the stingless-bee *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). *Microbiology (United Kingdom)*, *165*(3), 292–301. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000754>
- Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F. B., de Melo, A. M. M. F., Balestieri, J. B. P., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A. L., de Picoli Souza, K., & Dos Santos, E. L. (2014). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona*

- orbigny (Hymenoptera, Apidae). *Food and Chemical Toxicology*, 65(January), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.008>
- Cano, R. J., & Borucki, M. K. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science (New York, N. Y.)*, 268(5213), 1060–1064. <https://doi.org/10.1126/science.7538699>
- Cano, R. J., Borucki, M. K., Higby-Schweitzer, M., Poinar, H. N., Poinar Jnr, G. O., & Pollard, K. J. (1994). Bacillus DNA in fossil bees: An ancient symbiosis? *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2164–2167.
- Cardoza, Y. J., Klepzig, K. D., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria in oral secretions of an endophytic insect inhibit antagonistic fungi. *Ecological Entomology*, 31(6), 636–645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00829.x>
- Cariveau, D. P., Elijah Powell, J., Koch, H., Winfree, R., & Moran, N. A. (2014). Variation in gut microbial communities and its association with pathogen infection in wild bumble bees (*Bombus*). *The ISME Journal*, 8(12), 2369–2379. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.68>
- Castanheira, E. B., & Contel, E. P. B. (1995). Isoenzymes related to flight activity in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera:Apidae:Meliponinae): Evidence of postranslational modification of the hexokinase and detection of new glycerol-3-phosphate dehydrogenase variants. *Biochemical Genetics*, 33(11–12), 365–376. <https://doi.org/10.1007/BF00554595>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Invernizzi, C., Tomasco, I., Basualdo, M., Rodriguez, M., Zunino, P., & Antúnez, K. (2019). Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160(July 2018), 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.11.004>
- Castillo, J. D., Lawrence, K. S., & Kloepper, J. W. (2013). Biocontrol of the reniform nematode by *Bacillus firmus* GB-126 and *Paecilomyces lilacinus* 251 on cotton. *Plant Disease*, 97(7), 967–976. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0978-RE>
- Chaabouni, I., Guesmi, A., & Cherif, A. (2012). Secondary Metabolites of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology. In *Bacillus turingiensis Biotechnology* (pp. 347–366). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2>
- Chakrabarti, P., Rana, S., Sarkar, S., Smith, B., & Basu, P. (2015). Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*, 46(1),

- 107–129. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0308-z>
- Chen, Y., Pettis, J. S., & Feldlaufer, M. F. (2005). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, *90*(2), 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.005>
- Chernin, L., Brandis, A., Ismailov, Z., & Chet, I. (1996). Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Current Microbiology*, *32*(4), 208–212. <https://doi.org/10.1007/s002849900037>
- Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M., & Kang, J. S. (2011). Characterization of *Bacillus mojavenis* KJS-3 for industrial applications. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(2), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0215-z>
- Christe, P., Oppliger, A., Bancalà, F., Castella, G., & Chapuisat, M. (2003). Evidence for collective medication in ants. *Ecology Letters*, *6*(1), 19–22. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00395.x>
- Cooley, J. R., Marshall, D. C., & Hill, K. B. R. (2018). A specialized fungal parasite (*Massospora cicadina*) hijacks the sexual signals of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada). *Scientific Reports*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19813-0>
- Corby-Harris, V., Maes, P. W., & Anderson, K. E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PloS One*, *9*(4), e95056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095056>
- Corby-Harris, V., Snyder, L. A., Schwan, M. R., Maes, P. W., McFrederick, Q. S., & Anderson, K. E. (2014). Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(24), 7460–7472. <https://doi.org/10.1128/AEM.02043-14>
- Core, A., Runckel, C., Ivers, J., Quock, C., Siapno, T., DeNault, S., Brown, B., DeRisi, J., Smith, C. D., & Hafernik, J. (2012). A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *apocephalus borealis*. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029639>
- Cornforth, D. M., & Foster, K. R. (2013). Competition sensing: The social side of bacterial stress responses. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(4), 285–293.

- <https://doi.org/10.1038/nrmicro2977>
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V. G., VanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., ... Lipkin, W. I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5848), 283–287.
<https://doi.org/10.1126/science.1146498>
- Coyte, K. Z., Schluter, J., & Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science (New York, NY)*, *350*(6261), 663–666.
<https://doi.org/10.1126/science.aad2602>
- Crall, J. D., Switzer, C. M., Oppenheimer, R. L., Ford Versypt, A. N., Dey, B., Brown, A., Eyster, M., Guérin, C., Pierce, N. E., Combes, S. A., & de Bivort, B. L. (2018). Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6415), 683–686.
<https://doi.org/10.1126/science.aat1598>
- Crotti, E., Sansonno, L., Prosdocimi, E. M., Vacchini, V., Hamdi, C., Cherif, A., Gonella, E., Marzorati, M., & Balloi, A. (2013). Microbial symbionts of honeybees: A promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology*, *30*(6), 716–722.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.05.004>
- Currie, C. R., Scottt, J. A., Summerbell, R. C., & Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, *398*(6729), 701–704. <https://doi.org/10.1038/19519>
- Czekaj, T., Ciszewski, M., & Szewczyk, E. M. (2015). *Staphylococcus haemolyticus* – An emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology (United Kingdom)*, *161*(11), 2061–2068. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000178>
- De Bary, A. (1884). *Vergleichende morphologie und biologie der Pilze Mycetozen und Bacterien*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S. F., Schuch, D. M. T., Titra, D., Tomkies, V., & Ritter, W. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(6), 583–590.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x>
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard,

- S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O. A., Mieszkin, S., Millet, L. J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B. P., Olsson, S., van Elsas, J. D., & Wick, L. Y. (2018). Bacterial-fungal interactions: Ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(3), 335–352. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008>
- Dharampal, P. S., Carlson, C., Currie, C. R., & Steffan, S. A. (2019). Pollen-borne microbes shape bee fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1904). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2894>
- Diaz, S., de Souza Urbano, S., Caesar, L., Blochtein, B., Sattler, A., Zuge, V., & Haag, K. L. (2016). Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, *143*, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.012>
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., & Charnley, A. K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, *8*(12), 1291–1298. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00828.x>
- Disayathanoowat, T., Yoshiyama, M., Kimura, K., & Chantawannakul, P. (2012). Isolation and characterization of bacteria from the midgut of the Asian honey bee (*Apis cerana indica*). *Journal of Apicultural Research*, *51*(4), 312–319. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.4.04>
- Disayathanoowat, T., Young, J. P. W., Helgason, T., & Chantawannakul, P. (2012). T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, *79*(2), 273–281. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01216.x>
- Djukic, M., Poehlein, A., Strauß, J., Tann, F., Leimbach, A., Hoppert, M., & Daniel, R. (2015). High quality draft genome of *Lactobacillus kunkeei* EFB6, isolated from a German European foulbrood outbreak of honeybees. *Standards in Genomic Sciences*, *10*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-16>
- Dolezal, A. G., & Toth, A. L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, *26*, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.006>
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. *Annu Rev Entomol*, *43*, 17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17>

- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Douglas, A. E. (2010). *The symbiotic habit*. Princeton University Press.
<https://books.google.com.co/books/princeton?id=gaAG1I50OkAC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Douglas, A. E. (2014). Symbiosis as a General Principle in Eukaryotic Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(a016113), 1–12.
- Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 17–34.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Schisler, D. A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biological Control*, 64(2), 166–175.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.002>
- Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1212–1217.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
- Durvasula, R. V., Sundaram, R. K., Kirsch, P., Hurwitz, I., Crawford, C. V., Dotson, E., & Beard, C. B. (2008). Genetic transformation of a Corynebacterial symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 119(1), 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.020>
- Egamberdieva, D., Botir, H., Abeer, H., & Abd-Allah, E. F. (2014). Characterization of salt tolerant *Enterobacter hormaechei* strain associated with tomato root grown in arid saline soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(5), 4231–4239.
- Elbanna, K., Elnaggar, S., & Bakeer, A. (2014). Characterization of *Bacillus altitudinis* as a New Causative Agent of Bacterial Soft Rot. *Journal of Phytopathology*, 162(11–12), 712–722. <https://doi.org/10.1111/jph.12250>
- Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2016). Beyond 16S rRNA community profiling: Intra-species diversity in the gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01475>

- Endo, A., & Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 444–448. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.06.002>
- Engel, P., Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Frischella perrara gen. nov., sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from the gut of the honeybee, *Apis mellifera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART10), 3646–3651. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049569-0>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Engel, P., Stepanauskas, R., & Moran, N. A. (2014). Hidden Diversity in Honey Bee Gut Symbionts Detected by Single-Cell Genomics. *PLoS Genetics*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004596>
- Evans, J. D., & Armstrong, T.-N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*, 6, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-4>
- Evans, J. D., & Schwarz, R. S. (2011). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19(12), 614–620. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>
- Falchetti, A. M., & Nates-Parra, G. (2002). Las Hijas del Sol: Las abejas sin aguijón en el mundo Uwa, Sierra Nevada del Cocuy, Colombia. In A. Ulloa (Ed.), *Rostros culturales de la Fauna: Las relaciones entre los humanos y los animales en el contexto colombiano* (pp. 174–215). FUNDACIÓN NATURA.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group B. amyloliquefaciens” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., & Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- Federici, E., Leonardi, V., Giubilei, M. A., Quarantino, D., Spaccapelo, R., D’Annibale, A., &

- Petruccioli, M. (2007). Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1143-1>
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2009). Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*, 299(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.05.010>
- Ferreira, F. A. da S., Arcos, A. N., Sampaio, R. T. de M., Rodrigues, I. B., & Tadei, W. P. (2015). Effect of *Bacillus sphaericus* Neide on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and associated insect fauna in fish ponds in the Amazon. *Revista Brasileira de Entomologia*, 59(3), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2015.03.013>
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S5–S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016). Beeswax : A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 839–843. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>
- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., & Brown, M. J. F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506(7488), 364–366. <https://doi.org/10.1038/nature12977>
- Gamboa, M. V., & Figueroa, J. (2009). Poder antibacterial de mieles de *Tetragonisca angustula*, valorada por concentración mínima inhibitoria. *Acta Biológica Colombiana*, 14(2), 97–106.
- Gamboa, M. V., Ravoet, J., Brunain, M., Smagghe, G., Meeus, I., Figueroa, J., Riaño, D., & de Graaf, D. C. (2015). Bee pathogens found in *Bombus atratus* from Colombia: A case study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 129, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.013>
- García-García, D., Rojas-Mogoyón, M., & Sánchez-Nieves, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 123–129.
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2005). Class III. Gammaproteobacteria class. nov. In B. DJ, K. NR, S. JT, & G. GM (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed.). Springer. <https://lpsn.dsmz.de/class/gammaproteobacteria>
- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 87–97.

- <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis a review. *Bee World*, 60(2), 59–84.
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of Pollen and Bee Bread : the Genus Bacillus. *Apidologie*, 10(3), 269–274. <https://doi.org/10.1051/apido:19790304>
- Gilliam, M. (1990). Bacteria belonging to the genus Bacillus associated with three species of solitary bees *. *Apidologie*, 21, 99–105. <https://doi.org/10.1051/apido:19900202>
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155(1997), 1–10.
- Gilliam, M., Buchmann, S. L., & Lorenz, B. J. (1984). Microbial flora of the larval Provisions of the Solitary Bees, *Centris pallida*. *Apidologie*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1051/apido:19840101>
- Gilliam, M., Buchmann, S. L., Lorenz, B. J., & Roubik, D. W. (1985). Microbiology of the larval provisions of the stingless bee *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. *Biotropica*, 17(1), 28–31. <https://doi.org/10.2307/2388374>
- Gilliam, M., & Morton, H. L. (1978). Bacteria Belonging To the Genus Bacillus Isolated From Honey Bees, *Apis Mellifera*, Fed 2,4-D and Antibiotics. *Apidologie*, 9(3), 213–222. <https://doi.org/10.1051/apido:19780305>
- Gilliam, M., Roubik, D. W., & Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21(2), 89–97.
- Goettler, W., Kaltenpoth, M., Herzner, G., & Strohm, E. (2007). Morphology and ultrastructure of a bacteria cultivation organ: The antennal glands of female European beewolves, *Philanthus triangulum* (Hymenoptera, Crabronidae). *Arthropod Structure and Development*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2006.08.003>
- Gomez-Moracho, T., Heeb, P., & Lihoreau, M. (2017). Effects of parasites and pathogens on bee cognition. *Ecological Entomology*, 42, 51–64. <https://doi.org/10.1111/een.12434>
- Gonzalez, D., Sabnis, A., Foster, K. R., & Mavridou, D. A. I. (2018). Costs and benefits of provocation in bacterial warfare. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), 7593–7598. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801028115>
- Goswami, M., & Deka, S. (2019). Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria

- Bacillus altitudinis MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178(March), 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.003>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229).
<https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Grandlic, C. J., Mendez, M. O., Chorover, J., Machado, B., & Maier, R. M. (2008). Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environmental Science and Technology*, 42(6), 2079–2084. <https://doi.org/10.1021/es072013j>
- Graystock, P., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proc. R. Soc. B*, 282, 20151371. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1371>
- Grupe, A. C., & Quandt, C. A. (2020). A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS Pathogens*, 16(6), e1008580. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008580>
- Guzman-Novoa, E., Md Hamiduzzaman, M., Anguiano-Baez, R., Correa-Benítez, A., Castañeda-Cervantes, E., & Arnold, N. I. (2015). First detection of honey bee viruses in stingless bees in North America. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 93–95. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1100154>
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., Ricci, I., Boudabous, A., Borin, S., Manino, A., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., & Cherif, A. (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 524–533. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01609.x>
- Hameed, R. H., Abbas, F. M., & Hameed, I. H. (2018). Bioactive chemical analysis of *Enterobacter aerogenes* and test of its anti-fungal and anti-bacterial activity and determination. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 9(5), 442–448. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2018.00484.9>
- Hawver, L. A., Jung, S. A., & Ng, W. L. (2016). Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 738–752.

- <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw014>
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., & Berkeley, C. W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *46*(1), 270–279.
- Hladik, M. L., Vandever, M., & Smalling, K. L. (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Science of the Total Environment*, *542*, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.077>
- Hoffmann, D., Pettis, J. S., & Neumann, P. (2008). Potential host shift of the small hive beetle (*Aethina tumida*) to bumblebee colonies (*Bombus impatiens*). *Insectes Sociaux*, *55*(2), 153–162. <https://doi.org/10.1007/s00040-008-0982-9>
- Hogue, C. (1993). *Latin American insects and Entomology* (Vol. 15, Issue 4).
- Hoy, M. (2013). Genetic Systems, Genome Evolution, and Genetic Control of Embryonic Development in Insects. In *Insect Molecular Genetics* (pp. 103–179).
- Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Duskocil, I., Tyl, J., & Kamler, M. (2015). *Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location*. 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118707>
- Hroncova, Z., Killer, J., Haki, J., Titera, D., & Havlik, J. (2019). In-hive variation of the gut microbial composition of honey bee larvae and pupae from the same oviposition time. *BMC Microbiology*, *19*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1490-y>
- Huang, S., & Zhang, H. (2013). The Impact of Environmental Heterogeneity and Life Stage on the Hindgut Microbiota of *Holotrichia parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057169>
- Hubert, J., Bicianova, M., Ledvinka, O., Kamler, M., Lester, P. J., Nesvorna, M., Kopecky, J., & Erban, T. (2017). Changes in the Bacteriome of Honey Bees Associated with the Parasite *Varroa destructor*, and Pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology*, *73*(3), 685–698. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0869-7>
- Hughes, D. P., Andersen, S. B., Hywel-Jones, N. L., Himaman, W., Billen, J., & Boomsma, J. J. (2011). Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecology*, *11*.

- <https://doi.org/10.1186/1472-6785-11-13>
- Hulcr, J., Adams, A. S., Raffa, K., Hofstetter, R. W., Klepzig, K. D., & Currie, C. R. (2011). Presence and Diversity of Streptomyces in Dendroctonus and Sympatric Bark Beetle Galleries Across North America. *Microbial Ecology*, *61*(4), 759–768.
<https://doi.org/10.1007/s00248-010-9797-0>
- Hussein, E. I., Jacob, J. H., Shakhathreh, M. A. K., Abd Al-Razaq, M. A., Juhmani, A. S. F., & Cornelison, C. T. (2018). Detection of antibiotic-producing Actinobacteria in the sediment and water of Ma'in thermal springs (Jordan). *Germs*, *8*(4), 191–198.
<https://doi.org/10.18683/germs.2018.1146>
- Hwang, C. F., Chen, Y. A., Luo, C., & Chiang, W. D. (2016). Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. *International Journal of Food Science and Technology*, *51*(3), 681–689. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13030>
- Ignasiak, K., & Maxwell, A. (2017). Antibiotic-resistant bacteria in the guts of insects feeding on plants: Prospects for discovering plant-derived antibiotics. *BMC Microbiology*, *17*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1133-0>
- Inoue, T., Sakagami, S. F., Salmah, S., & Yamane, S. (1984). The process of colony multiplication in the Sumatran stingless bee *Trigona* (*Tetragonula*) *laeviceps*. *Biotropica*, *16*(2), 100–111. <http://www.jstor.org/stable/2387841>
- Jacob, C. R. de O., Zanardi, O. Z., Malaquias, J. B., Souza Silva, C. A., & Yamamoto, P. T. (2019). The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, *224*, 65–70.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>
- Jeong, H., Jeong, D. E., Kim, S. H., Song, G. C., Park, S. Y., Ryu, C. M., Park, S. H., & Choi, S. K. (2012). Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613 T. *Journal of Bacteriology*, *194*(15), 4148–4149.
<https://doi.org/10.1128/JB.00805-12>
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, *84*(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.08.007>
- Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B. S., & Yu, S. H. (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases.

- Mycobiology*, 41(4), 234–242. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.234>
- Jones, J. C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufailia, H., Balfour, N. J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, F. L. W., & Hughes, W. O. H. (2018). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution*, 8(1), 441–451. <https://doi.org/10.1002/ece3.3597>
- Jones, J. C., Fruciano, C., Marchant, J., Hildebrand, F., Forslund, S., Bork, P., Engel, P., & Hughes, W. O. H. (2018). The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insectes Sociaux*, 65(3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s00040-018-0624-9>
- Jurat-Fuentes, J. L., & Jackson, T. a. (2012). Bacterial entomopathogens. In *Insect Pathology* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00008-7>
- Kakumanu, M. L., Reeves, A. M., Anderson, T. D., Rodrigues, R. R., & Williams, M. A. (2016). Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01255>
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology*, 17(12), 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.006>
- Kaltenpoth, M., & Engl, T. (2013). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12089>
- Kapheim, K. M., Rao, V. D., Yeoman, C. J., Wilson, B. A., White, B. A., Goldenfeld, N., & Robinson, G. E. (2015). Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS One*, 10(4), e0123911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123911>
- Kaya, H. K., & Vega, F. E. (2012). *Insect pathology* (second). Elsevier. <https://doi.org/10.1007/s007690000247>
- Kerr, J. R. (1999). Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(3), 129–142. <https://doi.org/10.1080/089106099435709>
- Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Erkosar, B., & Engel, P. (2019). Gut microbiota structure differs between honey bees in winter and summer. *BioRxiv*, 41(0), 703512. <https://doi.org/10.1101/703512>
- Kešnerová, L., Mars, R. A. T., Ellegaard, K. M., Troilo, M., Sauer, U., & Engel, P. (2017).

- Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biology*, 15(12), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003467>
- Kešnerová, L., Moritz, R., & Engel, P. (2016). *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 414–421. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000736>
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., & Fukatsu, T. (2012). Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8618–8622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200231109>
- Koch, H., Abrol, D. P., Li, J., & Schmid-Hempel, P. (2013). Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, 22(7), 2028–2044. <https://doi.org/10.1111/mec.12209>
- Koch, H., Cisarovsky, G., & Schmid-Hempel, P. (2012). Ecological effects on gut bacterial communities in wild bumblebee colonies. *Journal of Animal Ecology*, 81(6), 1202–1210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2012.02004.x>
- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011a). Bacterial Communities in Central European Bumblebees: Low Diversity and High Specificity. *Microbial Ecology*, 62(1), 121–133. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9854-3>
- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011b). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19288–19292. <https://doi.org/10.1073/pnas.11110474108>
- König, H., & Varma, A. (2006). Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates. In *Microbe Magazine* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/3-540-28185-1>.
- Kroiss, J., Kaltenpoth, M., Schneider, B., Schwinger, M. G., Hertweck, C., Maddula, R. K., Strohm, E., & Svatos, A. (2010). Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nature Chemical Biology*, 6(4), 261–263. <https://doi.org/10.1038/nchembio.331>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees Subject Category : Subject Areas : *Royal Society Open Science*, 4.
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the Betaproteobacteria, and

- Gilliamella apicola gen. nov., sp. nov., a memb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 6), 2008–2018.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.044875-0>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2015). Evolution of host specialization in gut microbes: The bee gut as a model. *Gut Microbes*, 6(3), 214–220.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1047129>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Laffineur, K., Avesani, V., Cornu, G., Charlier, J., Janssens, M., Wauters, G., & Delmée, M. (2003). Bacteremia due to a novel Microbacterium species in a patient with leukemia and description of Microbacterium paraoxydans sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2242–2246. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2242-2246.2003>
- Lamei, S., Hu, Y. O. O., Olofsson, T. C., Andersson, A. F., Forsgren, E., & Vásquez, A. (2017). Improvement of identification methods for honeybee specific Lactic Acid Bacteria; Future approaches. *PLoS ONE*, 12(3), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174614>
- Landaverde González, P., Calderón, C., & Escobedo, N. (2010). *Identificación de infecciones virales en abejas melíferas del Suroccidente de Guatemala por medio de RT-PCR. August*, 1–55.
- Langenheim, J. H. (2003). *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*. Cambridge Timber Press.
- Lavinás, F. C., Macedo, E. H. B. C., Sá, G. B. L., Amaral, A. C. F., Silva, J. R. A., Azevedo, M. M. B., Vieira, B. A., Domingos, T. F. S., Vermelho, A. B., Carneiro, C. S., & Rodrigues, I. A. (2019). Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 29(3), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.007>
- Le Roes-Hill, M., Rohland, J., & Burton, S. (2011). Actinobacteria isolated from termite guts as a source of novel oxidative enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(4), 589–605.
<https://doi.org/10.1007/s10482-011-9614-x>
- Lehmberg, L., Dworschak, K., & Blüthgen, N. (2008). Defensive behavior and chemical deterrence against ants in the stingless bee genus Trigona (Apidae, Meliponini).

- Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47(1), 17–21.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.47.1.03>
- Leonhardt, S. D., & Blüthgen, N. (2016). A Sticky Affair : Resin Collection by Bornean Stingless Bees Published by : Association for Tropical Biology and Conservation All use subject to JSTOR Terms and Conditions A Sticky Affair : Resin Collection by Bornean Stingless Bees. *Biotropica*, 41(6), 730–736.
- Leonhardt, S. D., & Kaltenpoth, M. (2014). Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PloS One*, 9(8), e105718.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105718>
- Levitt, A. L., Singh, R., Cox-Foster, D. L., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N., & Holmes, E. C. (2013). Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Research*, 176(1–2), 232–240.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.06.013>
- Lewis, Z., & Lizé, A. (2015). Insect behaviour and the microbiome. *Current Opinion in Insect Science*, 9(March), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.003>
- Li, B., Wang, B., Pan, P., Li, P., Qi, Z., Zhang, Q., Shi, C., Hao, W., Zhou, B., & Lin, R. (2019). *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab. *Biocontrol Science and Technology*, 29(10), 1009–1022.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1641791>
- Li, J. H., Evans, J. D., Li, W. F., Zhao, Y. Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., Li, Z. G., Hamilton, M., & Chen, Y. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to nosema infection. *PLoS ONE*, 12(11), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187505>
- Li, J., Qin, H., Wu, J., Sadd, B. M., Wang, X., Evans, J. D., Peng, W., & Chen, Y. (2012). The Prevalence of Parasites and Pathogens in Asian Honeybees *Apis cerana* in China. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047955>
- Little, A. E. F., Murakami, T., Mueller, U. G., & Currie, C. R. (2006). Defending against parasites: Fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters*, 2(1), 12–16.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0371>
- Lokvam, J., & Braddock, J. F. (1999). Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia graniflora* (Clusiaceae). *Oecologia*, 119(5), 534–540.

- Lóriga Peña, W., Fonte Carballo, L., & Demedio Lorenzo, J. (2014). Reporte de *Aethina tumida* Murray (Coleoptera, Nitidulidae) en colonias de la abeja sin aguijón *Melipona beecheii* Bennett de Matanzas y Mayabeque. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 201–204.
- Lozano, L. C., & Dussán, J. (2013). Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(8), 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1301-9>
- Lu, X., Zhou, D., Chen, X., Zhang, J., Huang, H., & Wei, L. (2017). Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant and Soil*, 416(1–2), 53–66. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3195-z>
- Ludvigsen, J., Porcellato, D., Amdam, G. V., & Rudi, K. (2018). Addressing the diversity of the honeybee gut symbiont *Gilliamella*: Description of *Gilliamella apis* sp. nov., isolated from the gut of honeybees (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(5), 1762–1770. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002749>
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G., & Rudi, K. (2015). Shifts in the Midgut/Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. *Microbes and Environments*, 30(3), 235–244. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15019>
- Ma, Z., Wang, N., Hu, J., & Wang, S. (2012). Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. *Journal of Antibiotics*, 65(6), 317–322. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.19>
- Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 25(21), 5439–5450. <https://doi.org/10.1111/mec.13862>
- Magalhaes-Freitas, B. (2003). Meliponíneos. In *A vida das abelhas* (p. 9).
- Manchola, L., & Dussán, J. (2014). *Lysinibacillus sphaericus* and *Geobacillus* sp Biodegradation of petroleum hydrocarbons and biosurfactant production. *Remediation Journal*, 26(2), 101–108. <https://doi.org/10.1002/rem>

- Marche, M. G., Satta, A., Floris, I., Pusceddu, M., Buffa, F., & Ruiu, L. (2019). Quantitative variation in the core bacterial community associated with honey bees from Varroa-infested colonies. *Journal of Apicultural Research*, 58(3), 444–454. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1589669>
- Marchi, A., & Utkhede, R. S. (1994). Effect of *Enterobacter aerogenes* on the Rhizosphere Microflora of Apple Trees. *Journal of Phytopathology*, 141(2), 127–132. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1994.tb01453.x>
- Margulis, L., Jorgensen, J. Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F. A., & Lo, S. C. (1998). The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1236–1241. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1236>
- Martinez-Fortun, S., Ruiz, C., Acosta Quijano, N., & Vit, P. (2018). Rural-Urban Meliponiculture and Ecosystems in Neotropical Areas. *Scaptotrigona*, a Resilient Stingless Bee? In *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology* (pp. 421–434). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5>
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Ruepell, O., Tingek, S., & Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>
- Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2830–2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>
- Matarrita-Carranza, B., Moreira-Soto, R. D., Murillo-Cruz, C., Mora, M., Currie, C. R., & Pinto-Tomas, A. A. (2017). Evidence for widespread associations between neotropical hymenopteran insects and Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02016>
- Mcart, S. H., Koch, H., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2014). Arranging the bouquet of disease: Floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. *Ecology Letters*, 17(5), 624–636. <https://doi.org/10.1111/ele.12257>
- Mcfall-ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V, Domazet-Loso, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Nealson, K., Pierce, N. E., Rawls, J. F., Reid, A., Ruby, E. G., Rumpho, M., Sanders, J. G., ... Wernegreen, J. J. (2013). Animals in a bacterial world, a new

- imperative for the life sciences. *PNAS Early Edition*, 1–8.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>
- McMahon, D. P., Fürst, M. A., Caspar, J., Theodorou, P., Brown, M. J. F., & Paxton, R. J. (2015). A sting in the spit: Widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *Journal of Animal Ecology*, *84*(3), 615–624.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12345>
- McMenamin, A. J., & Flenniken, M. L. (2018). Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science*, *26*, 120–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.009>
- Meeus, I., Brown, M. J. F., De Graaf, D. C., & Smagghe, G. (2011). Effects of Invasive Parasites on Bumble Bee Declines. *Conservation Biology*, *25*(4), 662–671.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01707.x>
- Meidong, R., Doolgindachbaporn, S., Jamjan, W., Sakai, K., Tashiro, Y., Okugawa, Y., & Tongpim, S. (2017). A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (Phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *Journal of General and Applied Microbiology*, *63*(4), 246–253.
<https://doi.org/10.2323/jgam.2016.12.002>
- Mendes, T. D., Borges, W. S., Rodrigues, A., Solomon, S. E., Vieira, P. C., Duarte, M. C. T., & Pagnocca, F. C. (2013). Anti-Candida properties of urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. *BioMed Research International*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/835081>
- Mendoza, A. R., Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2008). In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology*, *18*(4), 377–389.
<https://doi.org/10.1080/09583150801952143>
- Menegatti, C., Da Paixão Melo, W. G., Carrão, D. B., De Oliveira, A. R. M., Do Nascimento, F. S., Lopes, N. P., & Pupo, M. T. (2018). *Paenibacillus polymyxa* Associated with the Stingless Bee *Melipona scutellaris* Produces Antimicrobial Compounds against Entomopathogens. *Journal of Chemical Ecology*, *44*(12), 1158–1169. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-1028-z>
- Menezes, C., Coletto-Silva, A., Gazeta, G. S., & Kerr, W. E. (2009). Infestation by

- Pyemotes tritici (Acari, Pyemotidae) causes death of stingless bee colonies (Hymenoptera: Meliponina). *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 630–634. <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr021>
- Menezes, Cristiano, Vollet-Neto, A., Contrera, F., Venturieri, G., & Imperatriz-Fonseca, V. (2013). The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In *Pot-Honey* (pp. 153–171). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10
- Michener, C. D. (1990). Classification of the Apidae (Hymenoptera). *The University of Kansas Science Bulletin*, 54(4), 75–164.
- Michener, C. D. (2007). Tribe Meliponini. In *The bees of the world* (pp. 803–829). The John Hopkins University Press.
- Miller, D. L., Smith, E. A., & Newton, I. L. G. (2020). A bacterial symbiont protects honey bees from fungal disease. *BioRxiv*, 812, 2020.01.21.914325. <https://doi.org/10.1101/2020.01.21.914325>
- Mills, T. J. T. (2018). *Diversity and bioactivity of microorganisms associated with Australian Stingless bee species* (Issue August). The University of New South Wales.
- Miorin, P. L., Levy, N. C., Custodio, A. R., Bretz, W. A., & Marcucci, M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 913–920. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02050.x>
- Mohr, K. I., & Tebbe, C. C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8(2), 258–272. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x>
- Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., & Sabree, Z. L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE*, 7(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393>
- Moran, N. A., & Sloan, D. B. (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLoS Biology*, 13(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>

- Moure, J. S. (1946). Contribuição para o conhecimento dos Meliponinae (Hym., Apoidea). *Rev. Entomol.*, 17(3), 437–443. <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34161>
- Nafis, A., Elhidar, N., Oubaha, B., Samri, S. E., Niedermeyer, T., Ouhdouch, Y., Hassani, L., & Barakate, M. (2018). Screening for non-polyenic antifungal produced by actinobacteria from Moroccan habitats: Assessment of antimycin A19 production by *Streptomyces albidoflavus* AS25. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 7(2), 133–145. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.7.2.133>
- Naiem, E. S., Hrasnigg, N., & Crailsheim, K. (1999). Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 169(4–5), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s003600050221>
- Nakamura, L. K. (2000). Phylogeny of *Bacillus sphaericus*- like organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2000), 1715–1722.
- Naranjo, E. J., Dirzo, R., López, C., Jaime, A., Adrián, R. O., Gutiérrez-granados, G., Dirzo, R., Ballesté, A. M., Mandujano, C., Prieto, I., Manuel, H., Macías, H., & Mendoza, R. (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna. *Capital Natural de México*, II(September 2019), 247–276.
- Nates-Parra, G. (2001a). *Guía para la cría y manejo de la abeja angelita*. Convenio Andrés Bello. https://books.google.com.co/books?id=SLOMX2cfmclC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Nates-Parra, G. (2001b). Las abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana*, 2(3), 233–248. <http://teca.fao.org/sites/default/files/comments/files/77-259-1-PB.pdf>
- Nates-Parra, G. (2005). *Abejas corbiculadas de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia.
- Nates-Parra, G. (2009). Abejas silvestres y polinización. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*, No. 75(Roubik 1995), 7–20.
- Nates-Parra, G., & Lopera, A. V. (1989). Ciclo de desarrollo de *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula*, Latreille 1811 (Hymenoptera, Trigonini). *Acta Biológica Colombiana*, 1(5), 91–98.

- Nates-Parra, G., Rodríguez-c, Á., & Vélez, E. D. (2006). Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) en cementerios de la cordillera oriental de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 25–35.
- Nates-Parra, G., & Rosso-Londoño, J. M. (2013). Diversidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera : Meliponini) utilizadas en meliponicultura en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(3), 415–425.
- Nates-Parra, G., & Roubik, D. W. (1990). Sympatry among Subspecies of *Melipona favosa* in Colombia and a Taxonomic Revision. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 63(1), 200–203.
- Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ*, 2019(8), 1–20.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7478>
- Nishiwaki, H., Nakashima, K., Ishida, C., Kawamura, T., & Matsuda, K. (2007). Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3404–3411. <https://doi.org/10.1128/AEM.00021-07>
- Nogueira-Neto. (1954). Notas bionômicas sobre Meliponíneos III – Sobre a enxameagem (Hym. Apoidea). *Arquivos Do Museu Nacional*, 42, 419–452.
- Nogueira-Neto, P. (1997). *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. Parma LTDA.
- Nunes-Silva, P., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Gonçalves, L. S. (2009). Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). *Genetics and Molecular Research*, 8(2), 649–654. <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr026>
- Nunes-Silva, P., Piot, N., Meeus, I., Blochtein, B., & Smagghe, G. (2016). Absence of Leishmaniinae and Nosematidae in stingless bees. *Scientific Reports*, 6, 2–6.
<https://doi.org/10.1038/srep32547>
- O'Hara, C. M., Steigerwalt, A. G., Hill, B. C., Farmer, J. J., Fanning, G. R., & Brenner, D. J. (1989). *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as Enteric Group 75. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(9), 2046–2049.
- 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>
- Olaya, Y., Gutierrez, C., & Hernandez, C. (2014). Comparación entre la Calidad Microbiológica de Miel de *Tetragonisca Angustula* y de *Apis Mellifera*. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 67, 2(MAY 2014), 754–756.
- Oliveira, R. de C., Nunes, F. D. M. F., Campos, A. P. S., de Vasconcelos, S. M., Roubik, D. W., Goulart, L. R., & Kerr, W. E. (2004). Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on rapid markers. *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 181–186.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000200009>
- Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57(4), 356–363. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9202-0>
- Otterstatter, M. C., Whidden, T. L., & Owen, R. E. (2002). Contrasting frequencies of parasitism and host mortality among phorid and conopid parasitoids of bumble-bees. *Ecological Entomology*, 27(2), 229–237. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2002.00403.x>
- Pailan, S., Gupta, D., Apte, S., Krishnamurthi, S., & Saha, P. (2015). Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 103, 191–195.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.006>
- Palacios-López, O. A., González-Rangel, M. O., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2011). El papel de los antimicrobianos en la estructura de las comunidades microbianas en la naturaleza. *Tecnociencia Chihuahua*, V(1), 1–8.
- Park, Y. G., Mun, B. G., Kang, S. M., Hussain, A., Shahzad, R., Seo, C. W., Kim, A. Y., Lee, S. U., Oh, K. Y., Lee, D. Y., Lee, I. J., & Yun, B. W. (2017). *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS ONE*, 12(3), 1–28.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>
- Paul, J., Sarkar, A., & Varma, A. (1986). In vitro studies of cellulose digesting properties of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from termite gut. *Current Science*, December, 710–714.

- Pereira, K. de S., Meeus, I., & Smagghe, G. (2019). Honey bee-collected pollen is a potential source of *Ascosphaera apis* infection in managed bumble bees. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40804-2>
- Pérez-pérez, E. M., Esthe Suarez, Peña-Vera, M. J., González, A. C., & Vit, P. (2013). Antioxidant activity and microorganisms in nest products of *Tetragonisca* Laboratorio de Biología Molecular , Facultad de Farmacia y Bioanálisis , Apiterapia y Bioactividad , Departamento Ciencia de los Alimentos , Facultad de Farmacia y Bioanálisis . In P. Vit & D. W. Roubik (Eds.), *Stingless Bee Process Honey and Pollen in Cerumen Pots* (pp. 1–8).
- Porrini, M. P., Porrini, L. P., Garrido, P. M., de Melo e Silva Neto, C., Porrini, D. P., Muller, F., Nuñez, L. A., Alvarez, L., Iriarte, P. F., & Eguaras, M. J. (2017). *Nosema ceranae* in South American Native Stingless Bees and Social Wasp. *Microbial Ecology*, 74(4), 761–764. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0975-1>
- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7378–7387. <https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14>
- Prado, S. S., Hung, K. Y., Daugherty, M. P., & Almeida, R. P. P. (2010). Indirect effects of temperature on stink bug fitness, via maintenance of gut-associated symbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1261–1266. <https://doi.org/10.1128/AEM.02034-09>
- Praet, J., Parmentier, A., Schmid-hempel, R., Meeus, I., Smagghe, G., & Vandamme, P. (2018). Underestimated Bacterial Species Diversity Capable of Pathogen Inhibition. *Environmental Microbiology*, 20(1), 214–227. <https://doi.org/10.1111/emi.13973>
- Priest, F. G., Goodfellow, M., Shute, L. A., & Berkeley, C. W. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 69–71.
- 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>
- Przemieniecki, S. W., Kurowski, T. P., Kotlarz, K., Krawczyk, K., Damszel, M., Pszczółkowska, A., Kacprzak-Siuda, K., Chareńska, A., & Mastalerz, J. (2019). Bacteria Isolated from Treated Wastewater for Biofertilization and Crop Protection Against *Fusarium* spp. Pathogens. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(1),

- 1–11. <https://doi.org/10.1007/s42729-018-0001-9>
- Pucciarelli, A. B., Schapovaloff, M. E., Kummritz, S., Señuk, I. A., Brumovsky, L. A., & Dallagnol, A. M. (2014). Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología*, *46*(4), 325–332. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70091-4](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70091-4)
- Purkiss, T., & Lach, L. (2019). Pathogen spillover from *Apis mellifera* to a stingless bee. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1908). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1071>
- Quadt-Hallmann, A., Hallmann, J., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: Location and interaction with other plant-associated bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *43*(3), 254–259. <https://doi.org/10.1139/m97-035>
- Rabbee, M. F., Sarafat Ali, M., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., & Baek, K. hyun. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Rasmussen, C., & Cameron, S. a. (2007). A molecular phylogeny of the Old World stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) and the non-monophyly of the large genus *Trigona*. *Systematic Entomology*, *32*(1), 26–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00362.x>
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., & de Graaf, D. C. (2013). Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS ONE*, *8*(8), 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
- 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*, *26*(February), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
- Raymann, K., Motta, E. V. S., Girard, C., Riddington, I. M., Dinser, J. A., & Moran, N. A. (2018). Imidacloprid Decreases Honey Bee Survival Rates but Does Not Affect the Gut Microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(13), 1–13. <https://doi.org/10.1128/aem.00545-18>
- Reynaldi, F. J., De Giusti, M. R., & Alippi, A. M. (2004). Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. *Revista*

- Argentina de Microbiologia*, 36(1), 52–55.
- Ritter, W. (1981). Varroa Disease of the Honeybee *Apis Mellifera*. *Bee World*, 62(4), 141–153. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1981.11097838>
- Roberts, M. S., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1994). *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(2), 256–264. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-256>
- Rodríguez-Hernández, D., Melo, W. G. P., Menegatti, C., Lourenzon, V. B., Do Nascimento, F. S., & Pupo, M. T. (2019). Actinobacteria associated with stingless bees biosynthesize bioactive polyketides against bacterial pathogens. *New Journal of Chemistry*, 43(25), 10109–10117. <https://doi.org/10.1039/c9nj01619h>
- Rosa, C. a., Lachance, M., Silva, J. O. C., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., Silva, J. O. C., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Antonini, Y., & Martins, R. P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 271–275. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9)
- Rosa, C. a., & Lachance, M. A. (2005). *Zygosaccharomyces machadoi* sp. n., a yeast species isolated from a nest of the stingless bee *tetragonisca angustula*. *Lundiana*, 6, 27–29.
- Rosso-Londoño, J. M., & Nates-Parra, G. (2005). Meliponicultura : una actividad generadora de ingresos y servicios ambientales. *Leisa Revista de Agroecología*, 14–16.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, 37, 124–143. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Rubanov, A., Russell, K. A., Rothman, J. A., Nieh, J. C., & McFrederick, Q. S. (2019). Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40347-6>
- Rundlöf, M., Andersson, G. K. S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B. K., Pedersen, T. R., Yourstone, J., & Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77–80. <https://doi.org/10.1038/nature14420>
- Sabaté, D. C., Carrillo, L., & Carina Audisio, M. (2009). Inhibition of *Paenibacillus* larvae

- and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research in Microbiology*, 160(3), 193–199.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.002>
- Salas, M. F. (2018). *Microbiota asociada a los tubos de entrada de las colmenas de abejas sin aguijón en la defensa contra enemigos naturales*. Universidad Nacional de Colombia - Medellín.
- Salgado-Silva, M., Rabadzhiev, Y., Renon Eller, M., Iliev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017). Microorganisms in Honey. In V. de A. A. de Toledo (Ed.), *Honey analysis* (pp. 233–258). InTech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67262>
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment International*, 89–90, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>
- Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523–1538. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
- Savoia, D. (2012). Plant-derived antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, 7(8), 979–990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
- Scofield, H. N., & Mattila, H. R. (2015). Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *PLoS ONE*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121731>
- Senbagam, D., Gurusamy, R., & Senthilkumar, B. (2013). Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(12), 934–941.
[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60167-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60167-4)
- Shackleton, K., Toufaily, H. Al, Balfour, N. J., Nascimento, F. S., Alves, D. A., & Ratnieks, F. L. W. (2014). 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>
- Shanks, J. L. (2015). *New Australian stingless bee disease*.
- Shanks, J. L., Mark Haigh, A., Riegler, M., & Neil Spooner-Hart, R. (2017). First confirmed report of a bacterial brood disease in stingless bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 144, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.004>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Begum, Z., Pindi, P. K., Manorama, R., Padmanaban, D. A.,

- Shouche, Y. S., Pawar, S., Vaishampayan, P., Dutt, C. B. S., Datta, G. N., Manchanda, R. K., Rao, U. R., Bhargava, P. M., & Narlikar, J. V. (2009). *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(12), 2977–2986.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.002527-0>
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., Narlikar, J. V., & Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *56*(7), 1465–1473.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.64029-0>
- Shuaib, M., Ali, A., Ali, M., Panda, B. P., & Ahmad, M. I. (2013). Antibacterial activity of resin rich plant extracts. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *5*(4), 265–269.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.120073>
- Siefert, P., Hota, R., Ramesh, V., & Grünwald, B. (2020). Chronic within-hive video recordings detect altered nursing behaviour and retarded larval development of neonicotinoid treated honey bees. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65425-y>
- Simone-Finstrom, M., Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Strand, M. K., Rueppell, O., & Tarpy, D. R. (2016). Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Scientific Reports*, *6*(January), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/srep32023>
- Sinacori, M., Francesca, N., Alfonzo, A., Cruciat, M., Sannino, C., Settanni, L., & Moschetti, G. (2014). Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. *Food Microbiology*, *38*, 284–294.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.013>
- Singh, G. (1974). Endosymbiotic microorganisms in *Cletus signatus* walker (Coreidae: Heteroptera). *Experientia*, *30*(12), 1406–1407. <https://doi.org/10.1007/BF01919661>
- Singh, R., Levitt, A. L., Rajotte, E. G., Holmes, E. C., Ostiguy, N., Vanengelsdorp, D., Lipkin, W. I., Depamphilis, C. W., Toth, A. L., & Cox-Foster, D. L. (2010). RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE*, *5*(12).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014357>
- Sivakumar, G., Rangeshwaran, R., Yandigeri, M. S., Mohan, M., Venkatesan, T., & Verghese, A. (2016). Diversity of culturable gut bacteria associated with the field populations of cotton leafhopper (*Amrasca biguttula biguttula*) in India. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, *86*(2), 208–215.
- Sloan, D. B., & Moran, N. A. (2013). The evolution of genomic instability in the obligate endosymbionts of whiteflies. *Genome Biology and Evolution*, *5*(5), 783–793.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt044>
- Smith-Ramírez, C., Vieli, L., Barahona-Segovia, R. M., Montalva, J., Cianferoni, F., Ruz, L., Fontúrbel, F. E., Valdivia, C. E., Medel, R., Pauchard, A., Celis-Diez, J. L., Riesco, V., Monzón, V., Vivallo, F., & Neira, M. (2018). Las razones de por qué Chile debe detener la importación del abejorro comercial *Bombus terrestris* (Linnaeus) y comenzar a controlarlo. *Gayana (Concepción)*, *82*(2), 118–127.
<https://doi.org/10.4067/s0717-65382018000200118>
- Sovran, B., Planchais, J., Jegou, S., Straube, M., Lamas, B., Natividad, J. M., Agus, A., Dupraz, L., Glodt, J., Da Costa, G., Michel, M. L., Langella, P., Richard, M. L., & Sokol, H. (2018). Enterobacteriaceae are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome*, *6*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0538-9>
- Spangler, H. G. (1988). Sound and the Moths That Infest Beehives Spangler. *Florida Entomological Society*, *71*(4), 467–477.
- Sreerag, R. S., Jayaprakas, C. A., Ragesh, L., & Kumar, S. N. (2014). Endosymbiotic Bacteria Associated with the Mealy Bug, *Rhizoecus amorphophalli* (Hemiptera: Pseudococcidae). *International Scholarly Research Notices*, *2014*, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2014/268491>
- Srivastava, S., Bist, V., Srivastava, S., Singh, P. C., Trivedi, P. K., Asif, M. H., Chauhan, P. S., & Nautiyal, C. S. (2016). Unraveling aspects of *Bacillus amyloliquefaciens* mediated enhanced production of rice under biotic stress of *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*, *7*(MAY2016), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00587>
- Stackebrandt, E., Schumann, P., & Cui, X. L. (2004). Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou et al. 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(3),

- 685–688. <https://doi.org/10.1099/ijcs.0.02878-0>
- Subotic, S., Boddicker, A. M., Nguyen, V. M., Rivers, J., Briles, C. E., & Mosier, A. C. (2019). Honey bee microbiome associated with different hive and sample types over a honey production season. *PLoS ONE*, *14*(11), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223834>
- Sumpavapol, P., Tongyongk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., & Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(10), 2364–2370. <https://doi.org/10.1099/ijcs.0.018879-0>
- Syed Yaacob, S. N., Huyop, F., Kamarulzaman Raja Ibrahim, R., & Wahab, R. A. (2018). Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research*, *57*(3), 395–405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y., & Shen, Q. (2013). Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Management Science*, *69*(11), 1245–1252. <https://doi.org/10.1002/ps.3491>
- Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Nicoli, J. R., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., & Rosa, C. a. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(2003), 339–343. <https://doi.org/10.1099/ijcs.0.02262-0>
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2004). Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(12), 7185–7191. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7185>
- Tepaamorndech, S., Chantaraskha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M., Kirschke, C. P., Huang, L., & Visessanguan, W. (2019). Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, *86*, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.010>
- Terada., Y. (1972). *Enxameagem em Frieseomelitta varia* Lep. (Hymenoptera, Apidae). In

Homenagem a Warwick E. Kerr (pp. 293–299).

- Terefe, M., Tefera, T., & Sakhuja, P. K. (2012). Biocontrol (Formulation of *Bacillus firmus* (BioNem)) of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato plants in the field. *Ethiopian Journal of Agricultural Sciences*, 22(1), 102-116–116.
- Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10), 2123–2135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01606.x>
- Tsuru, D. (1962). Inhibitory effect of glycine on the production of amylase and proteinase by *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 26(5), 288–308. <https://doi.org/10.1080/00021369.1962.10857978>
- Ullah, A., Mushtaq, H., Fahad, S., Hakim, Shah, A., & Chaudhary, H. J. (2017). Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. *Microbiology (Russian Federation)*, 86(1), 119–127. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010155>
- Vallejo, M. A. (2020). *Microorganismos cultivables asociados a los estadios y edades de Trigona (Tetragonisca) angustula Latreille (Hymenoptera: Meliponini)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Van Veen, J. W., & Sommeijer, M. J. (2000). Colony reproduction in *Tetragonisca angustula* (Apidae, Meliponini). *Insectes Sociaux*, 47(1), 70–75. <https://doi.org/10.1007/s000400050011>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Donovall, L., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Tarpy, D. R., Hayes, J., & Pettis, J. S. (2009). “Entombed Pollen”: A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 147–149. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.008>
- Varma, R. V. (1986). *Seasonal Incidence and Possible Control of Important Insects Pests in Plantations of Ailanthus Triphysa. April*.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE*, 7(3), 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>
- Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 189–195.

- <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>
- Velez-Ruiz, R. I., Gonzalez, V. H., & Engel, M. S. (2013). Observations on the urban ecology of the Neotropical stingless bee *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of Melittology*, 15, 1–8.
<https://doi.org/10.17161/jom.v0i15.4528>
- Ventura, M., Canchaya, C., Zhang, Z., Bernini, V., Fitzgerald, G. F., & Van Sinderen, D. (2006). How high G+C Gram-positive bacteria and in particular bifidobacteria cope with heat stress: Protein players and regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), 734–759. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00031.x>
- Vicente Baitala, T., Aparecida Mangolin, C., De Alencar, V., De Toledo, A., & Colla Ruvolo-Takasusuki, M. C. (2006). RAPD polymorphism in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera; Meliponinae, Trigonini) populations. *Sociobiology*, 48(3), 861–873.
- Vijay Kumar, E., Srijana, M., Kiran Kumar, K., Harikrishna, N., & Reddy, G. (2011). A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(4), 403–409.
<https://doi.org/10.1007/s00449-010-0483-x>
- Villanueva-G, R., Roubik, D. W., & Colli-ucán, W. (2005). Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán peninsula. *Bee World*, 86(2), 35–41.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099651>
- Vit, P., & Pedro, S. R. M. (2013). *Pot-Honey: A legacy of stingless bee*.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Vojvodic, S., Rehan, S. M., & Anderson, K. E. (2013). Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. *PLoS ONE*, 8(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072106>
- Voulgari-Kokota, A., Ankenbrand, M. J., Grimmer, G., Steffan-Dewenter, I., & Keller, A. (2019). Linking pollen foraging of megachilid bees to their nest bacterial microbiota. *Ecology and Evolution*, 9(18), 10788–10800. <https://doi.org/10.1002/ece3.5599>
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kuo, H. P. (2008). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(3), 671–675.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65191-0>
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., Sorek, R., Tringe,

- S. G., Podar, M., Martin, H. G., Kunin, V., Dalevi, D., Madejska, J., Kirton, E., Platt, D., ... Leadbetter, J. R. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, *450*(November), 560–565. <https://doi.org/10.1038/nature06269>
- Watanabe, Y., Shinzato, N., & Fukatsu, T. (2003). Isolation of actinomycetes from termites' guts. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *67*(8), 1797–1801. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1797>
- Wei, G., Lai, Y., Wang, G., Chen, H., Li, F., & Wang, S. (2017). Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(23), 5994–5999. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703546114>
- Werner, W. (1933). Botanische Beschreibung haufiger am Buttersaureabbau beteiligter sporenbildender Bakterienspezies. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.*, *87*, 446–475.
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Microbiol*, *6*(10), 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Werren, John H. (2012). Symbionts provide pesticide detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(22), 8364–8365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206194109>
- Wille, A. (1983). Biology of the Stingless Bees. *Annual Review of Entomology*, *28*(1), 41–64. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.000353>
- Wong, A. C. N., Wang, Q. P., Morimoto, J., Senior, A. M., Lihoreau, M., Neely, G. G., Simpson, S. J., & Ponton, F. (2017). Gut Microbiota Modifies Olfactory-Guided Microbial Preferences and Foraging Decisions in *Drosophila*. *Current Biology*, *27*(15), 2397-2404.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.022>
- Xavier, V. M. V. M., Message, D., Picanço, M. C., Bacci, L., Silva, G. A., & Da Silva Benevenuto, J. (2010). Impact of botanical insecticides on indigenous stingless bees. *Sociobiology*, *56*(3), 713–723.
- Xi-Biao, J., Sun, R.-J., Jian-Qing, Z., Zheng-Jun, X., Zhu, L., Quiang, W., & Xiao-Ying, Y. (2012). Isolation and identification of *B altitudinis* ZJ 186 from Marine Soil Samples and its antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *Current Research in*

- Bacteriology*, 5(1), 13–23.
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., & Mcinroy, J. A. (2017). *Biological Control of Meloidogyne incognita by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton*. 101(5), 774–784. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1369-RE>
- Yaman, M., & Dem, E. (2016). *Investigation of bacterial pathogens of Chrysomela (Melasoma) populi (Coleoptera : Chrysomelidae)*. 56(1), 77–83.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W. M., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science and Technology*, 48(23), 13776–13784. <https://doi.org/10.1021/es504038a>
- Yoon, J. H., Kim, I. G., Kang, K. H., Oh, T. K., & Park, Y. H. (2003). *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), 1297–1303. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02365-0>
- Yoshiyama, M., & Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005>
- Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., Yoon, C., Nam, Y. Do, Kim, Y. J., Choi, J. H., Kim, J. Y., Shin, N. R., Kim, S. H., Lee, W. J., & Bae, J. W. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W. K., Koch, H., Engel, P., Steele, M. I., & Moran, N. A. (2016). Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio*, 7(6), 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01326-16>
- Zheng, H., Powell, J. E., Steele, M. I., Dietrich, C., & Moran, N. A. (2017). Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(18), 4775–4780. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701819114>
- Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47(November), 317–325.

<https://doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x>

Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H. R., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, *75*(3), 377–389.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x>

