

## CONTENIDO MICROBIOLÓGICO CULTIVABLE DEL TRACTO INTESTINAL Y POLEN ALMACENADO DE *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

### Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

DUBERNEY GARCÍA GARCÍA, MARCO ANDRÉS ROJAS MOGOLLÓN,  
JIMENA SÁNCHEZ NIEVES  
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Presentado agosto 22 de 2005, aceptado octubre 6 de 2005, correcciones enero 10 de 2006.

#### RESUMEN

Se caracterizaron los microorganismos cultivables asociados con *Apis mellifera*. Las muestras fueron tomadas a partir de polen almacenado (joven y maduro) y transportado en corbículas y tracto digestivo de las abejas (forrajeras y recién nacidas). Se aislaron bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, y *Arthrobacter* y hongos de los géneros *Rhizopus*, *Alternaria* y *Epicoccum*. De acuerdo a sus propiedades bioquímicas, algunas de estas bacterias pueden estar involucradas en la degradación de los compuestos de la capa externa del polen y son adquiridas por las abejas a través del alimento y contacto con otros individuos de la colmena. La presencia de los hongos se explica por su amplia distribución en el ambiente, ya que los tres géneros se encuentran comúnmente en el suelo y en las plantas que las abejas pueden seleccionar como fuente de alimento.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, polen, intestino, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Arthrobacter* sp., *Yersinia* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp.

#### ABSTRACT

Microorganisms associated with *Apis mellifera* were characterized. Samples were collected from storage pollen (young pollen and ripe pollen) and carried in corbículas, and bee's gut of newly born and adult workers. Bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* and *Arthrobacter* genus and molds of *Rhizopus*, *Alternaria* and *Epicoccum* genus were isolated. According to their biochemical properties some of these microbes may be involved in the outer pollen walls degradation and could have been acquired by the bees through food ingestion or contact with other bees. The molds presence is explicated by their wide environmental distribution; they are typically found in soil and plants chosen as food source by bees.

**Key words:** *Apis mellifera*, pollen, gut, *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Arthrobacter* sp., *Yersinia* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp.

## INTRODUCCIÓN

La evolución comportamental de las abejas está relacionada en gran parte con espacios físicos que constituyen ambientes particulares de nidificación como lo es el sustrato en que ellas desarrollan sus nidos (Seeley, 1985). En el caso de abejas sociales, la alteración del espacio está relegada casi exclusivamente a la adecuación del mismo para la instauración de estructuras construidas casi en su totalidad por dichas abejas, usando elementos del hábitat diferentes a los que el sustrato les ofrece de forma inmediata (Michener, 2000). Este tipo de comportamiento de nidificación muestra un manejo de recursos algo distinto al de las abejas solitarias, como es la recolección y manejo de polen para el aprovisionamiento de las celdas de cría (Roubik, 1989). El polen es el recurso proteico por excelencia utilizado por las abejas para la alimentación de sus crías y es manipulado antes de convertirlo en alimento larval, con el fin de eliminar ciertas capas de exinas indigeribles para estos insectos. Se han identificado compuestos como rafinosa, lactosa, stachiosa, xilosa, arabinosa, galactosa, ácido galacturónico, ácido glucónico y pectina que son en su mayoría compuestos tóxicos para *Apis mellifera*, mientras que especies de abejas silvestres como *Scaptotrigona postica* no presentan ninguna reacción desfavorable ante éstos (Zucoloto y Penedo, 1977). Esto indica que *A. mellifera* se ve obligada a tratar el polen antes de consumirlo para eliminar estos compuestos nocivos y debido al almacenaje que realizan en las celdas de la colmena, es muy probable que estos compuestos se degraden por acción de microorganismos, ya sean ambientales, transportados con el polen recolectado o provenientes del tracto intestinal de la abeja, ya que el alimento suministrado a las larvas es una mezcla de polen, miel y secreciones del buche de las abejas nodrizas. Los estudios realizados sobre microorganismos asociados con *A. mellifera* se han centrado en el contenido del tracto gastrointestinal, identificando básicamente bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Clostridium*, además de hongos y levaduras (Jeyaprakash *et al.*, 2003; Kacániová *et al.*, 2004). No obstante, aquellos microorganismos relacionados con el polen y su papel en los procesos de transformación de este recurso alimenticio han tenido poca atención. En el presente estudio se realizó una caracterización preliminar de los microorganismos presentes en el polen almacenado en las celdas de alimentación de una colmena de *A. mellifera*, así como en el tracto intestinal de las abejas recién nacidas y obreras, como un paso preliminar para determinar el origen y el posible papel que estos microorganismos pueden ejercer en la maduración del polen (de fuentes exógenas o provenientes del intestino de la abeja melífera).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El material biológico (polen y abejas) se colectó de las colmenas del Laboratorio de

Abejas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, de donde se extrajo un núcleo de almacenamiento y un núcleo de cría. También se colectaron especímenes de forrajeras cargadas de polen en la entrada del nido, las cuales fueron introducidas en viales estériles. En el laboratorio, se obtuvieron directamente del núcleo de almacenamiento las muestras de polen, tanto joven (sin opercular) como maduro. Posteriormente, estas muestras fueron sembradas en condiciones asépticas en agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (APD), realizando un barrido directamente sobre los medios de cultivo, al igual que la siembra de una dilución 1:100 de la muestra en solución salina estéril al 0,85%. De las abejas capturadas se extrajo el polen compactado en las corbículas, realizando el mismo procedimiento de siembra aplicado a las muestras de polen. Adicionalmente, se realizó la extracción aséptica del intestino de abejas recién nacidas y obreras adultas, el cual fue sembrado directamente en las placas de AN y APD. Se efectuaron pruebas de ubicuidad microbiana (Valencia, 2004), para lo cual se expusieron cajas de petri con los mismos medios de cultivo en las colmenas evaluadas para así tener un control ambiental de posibles bacterias y hongos contaminantes de las muestras, es decir, aquellos microorganismos que no forman parte del contenido microbiológico normal de las muestras. Las siembras en agar nutritivo fueron incubadas a 37° C durante 48 horas, mientras que las realizadas en APD se incubaron a 24° C por siete días.

#### AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Después del periodo de incubación, las bacterias fueron aisladas por la técnica de siembra por agotamiento (Madigan *et al.*, 2000) en placa de agar nutritivo y se realizaron descripciones de las características macroscópicas (colonias) y microscópicas (tinciones de *Gram* y diferenciales). Los hongos fueron aislados por inoculación independiente en APD de cada una de las colonias desarrolladas. Una vez aisladas, las bacterias fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas de utilización de sustratos, según los protocolos de Madigan *et al.* (2000) y Krieg y Holt (1984) e identificadas utilizando claves diagnósticas de acuerdo con Brenner (1984), Palleroni (1984), Jones y Collins (1986), Kandler y Weiss (1986) y Schleifer (1986). A su vez, los hongos fueron identificados por observación de las características macroscópicas de las colonias y microscópicas mediante la observación de la morfología en montajes empleando azul de lactofenol, siguiendo las claves de Domsch *et al.* (1993).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### BACTERIAS DEL POLEN Y TRACTO INTESTINAL DE *A. mellifera*

De acuerdo a las características macroscópicas, microscópicas y las pruebas bioquímicas de utilización de sustratos, se identificaron bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia* y *Arthrobacter* (Tabla 1). Los resultados obtenidos sugieren que el contenido microbiológico de cada una de las muestras, particularmente polen maduro e intestino, podría estar correlacionado, ya que algunas de las bacterias aisladas son comunes para ambas (Tabla 1). Bacterias encontradas en el polen maduro y en las corbículas se hallaron también en el tubo digestivo, sugiriendo que las abejas pueden ir adquiriendo su flora intes-

tinal normal por medio de su alimentación, teniendo en cuenta que el polen recolectado es sometido a un tratamiento que incluye adición de secreciones del buche y maduración, previos al suministro a las crías. El contenido del tracto intestinal de las abejas recién nacidas muestra una baja diversidad de bacterias en relación con las forrajeras, que sugiere un incremento a medida que la abeja asume su papel de obrera. Esto respalda lo señalado por Snowdon y Cliver (1996) y Kacániová *et al.* (2004) en cuanto a la forma de adquisición de la microflora intestinal por *A. mellifera*, que se da a través del consumo de polen, otros alimentos y por contacto con abejas de mayor edad dentro de la colonia, siendo el polen la fuente principal de microorganismos. Adicionalmente, de acuerdo con lo descrito por Guilliam (1997), las abejas obreras recién nacidas son inoculadas con microorganismos cuando comienzan a alimentarse, produciéndose la colonización del tracto intestinal cuatro días después de la emergencia del adulto. Por otro lado, la presencia de algunas de las bacterias que se aislaron en el presente estudio, como *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp. y *Pseudomonas* sp., encontradas en el intestino de las forrajeras, ha sido reportado en el tracto intestinal de *A. mellifera* por Kacániová *et al.* (2004), Jeyaprakash *et al.*, (2003) y por otros autores (Snowdon y Cliver, 1996). Estas bacterias han sido aisladas no solo del tracto intestinal de las abejas adultas, sino también de las larvas y sus heces, así como del polen corbicular y el polen almacenado. Parece probable que las bacterias sean endémicas del tracto digestivo de las abejas adultas y sean dispersadas desde las partes bucales de los adultos a las larvas y fuentes alimenticias (Guilliam, 1997).

Género	Intestino forrajera	Intestino recién nacida	Polen joven	Polen maduro	Polen en corbículas
<i>Proteus</i> sp.	X				
<i>Klebsiella</i> sp.	X	X			
<i>Streptococcus</i> sp.	X			X	X
<i>Micrococcus</i> sp.	X			X	
<i>Pseudomonas</i> sp.	X	X	X	X	X
<i>Yersinia</i> sp.				X	
<i>Lactobacillus</i> sp.			X		
<i>Arthrobacter</i> sp.				X	

Tabla 1. Géneros de bacterias presentes en polen e intestino de *A. mellifera*.

X=presencia del microorganismo

De acuerdo con varios autores (Guilliam, 1997; Jeyaprakash *et al.*, 2003), *Lactobacillus* también se encuentra registrado como parte de la flora bacteriana de *A. mellifera*. En el presente estudio esta bacteria se aisló de las muestras de polen joven (participando en las primeras etapas de su fermentación), el cual ha ingresado recientemente a la colonia, donde es recubierto con miel como parte del tratamiento de maduración, posiblemente las propiedades antibióticas de esta sustancia (Guilliam, 1997), podrían ejercer en algún grado inhibición del crecimiento de estas bacterias en el polen maduro. De acuerdo al comportamiento bioquímico de las bacterias frente a diferentes sustratos, es posible considerar las capas del polen como una fuente de nu-

trientes aprovechados por las bacterias por medio de degradación metabólica. Teniendo en cuenta que las cepas de *Streptococcus*, *Klebsiella* y *Arthrobacter* evaluadas en el presente estudio arrojaron resultados positivos para la fermentación de monosacáridos, se podría pensar que así mismo son responsables de la fermentación de los carbohidratos presentes en el polen para la producción de ácido láctico y su posterior maduración. En otros estudios, se ha reportado que bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Arthrobacter* son capaces de degradar xilosa, galactosa y arabinosa (Schleifer, 1986; Jones y Collins, 1986) los cuales se han referido como compuestos propios del polen que son tóxicos para *A. mellifera* (Zucoloto y Penedo, 1977). La cepa de *Pseudomonas* aislada, mostró capacidad de utilizar los carbohidratos presentes en el polen, en especial sacarosa y glucosa, como fuente de energía. Así mismo, se han reportado ciertas especies del género *Pseudomonas* degradadoras de pectina (Palleroni, 1984) y se sabe que estos microorganismos pueden aportar metabolitos útiles como enzimas y lípidos que pueden inducir la maduración del polen, aumentando el valor nutritivo y la disponibilidad de aminoácidos, mejorando la palatabilidad y digestibilidad. (Guilliam, 1997). Lo anterior argumenta a favor de la importancia de estos microorganismos en el proceso de transformación del polen para hacer posible su digestión por parte de las abejas.

#### HONGOS DE POLEN E INTESTINO DE *A. mellifera*

Se aislaron hongos pertenecientes a los géneros *Rhizopus* en las muestras de polen joven, *Alternaria* en las de polen de corbículas y *Epicoccum* en las de polen maduro. De acuerdo a la literatura, los hongos aislados presentan un amplio rango de distribución. *Epicoccum* sp. es un hongo encontrado frecuentemente en el ambiente asociado a la necromasa de numerosas plantas; se considera como invasor secundario de tejidos dañados y se ha observado sobre semillas, papel, insectos, textiles, piel de humanos y muy frecuentemente en el aire; además, presenta un mejor crecimiento en medios con altos contenidos de glucosa y sacarosa (Domsch *et al.*, 1993). Esta característica es una posible explicación de la presencia de este hongo en las muestras de polen maduro, en el que el contenido de carbohidratos puede ser mayor por su recubrimiento con miel que las abejas producen. Otro factor que podría determinar su crecimiento es la temperatura constante a la que se encuentra la colmena, que está un poco por encima de la ambiental. *Alternaria* sp. es uno de los hongos con mayor abundancia en el ambiente; se presenta generalmente en hortalizas y granos secos (Carrillo, 2003). La presencia en la muestra de polen en corbículas puede deberse a su predominio en el ambiente y a la utilización de material vegetal como fuente nutricional por el hongo. La ausencia de *Alternaria* en las otras muestras de polen puede atribuirse a un efecto de inhibición por parte de sustancias antimicóticas liberadas por bacterias y hongos adicionadas al polen con las secreciones de las abejas y la acción antimicrobiana de la miel, atribuida a su bajo pH, alta osmolaridad y generación enzimática de peróxido de hidrógeno vía glucosa oxidasa, además de la presencia de ácidos aromáticos y compuestos fenólicos (Mundo *et al.*, 2004; Iurlina y Fritz, 2005). Esta inhibición puede variar de acuerdo a las características particulares de la miel y el microorganismo. Finalmente, el género *Rhizopus* es un hongo altamente esporulante bastante común en el ambiente, asociado principalmente con material vegetal

(Ramírez *et al.*, 2000), por lo que es posible que éste hongo se encontrara en el polen desde que fue colectado en la planta y que al llevar poco tiempo en la colmena, no se ejerza una acción antibiótica sobre el mismo. Cabe anotar que se han reportado algunas especies de éste género en muestras de polen, que pueden ser benéficas por producir sustancias inhibidoras de microorganismos patógenos (Guilliam, 1997).

## AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología, en especial a Claudia Milena Martínez por el apoyo prestado y por facilitar la utilización de equipos y materiales. Al Laboratorio de Abejas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional, por los muestreos realizados en los apiarios y la utilización de la literatura del Laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

- BRENNER, DJ. Enterobacteriaceae. En Krieg, N. R. y Holt, J. G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William y Wilkins, Baltimore; 1984;1:408-516.
- CARRILLO L. *Alternaria*. En: Universidad Nacional de Salta. Los hongos de los alimentos y forrajes, Salta, Argentina; 2003;7:81-86.
- DOMSCH K, GAMS W, ANDERSON T. *Compendium of Soil Fungi*. Second edition. Academic Press; 1993;1-2:700.
- GUILLIAM M. Identification and Roles of Non-Pathogenic Microflora Associated with Honey Bees. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;155:1-10.
- IURLINA MO, FRITZ R. Characterization of Microorganisms in Argentinean Honeys From Different Sources. *Int J Food Microbiol*. 2005;105:297-304.
- JEYAPRAKASH A, MARJORIE A, HOY MA, ALLSOPP MH. Bacterial Diversity in Worker Adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) Assessed Using 16S rRNA Sequences. *J Invertebr Pathol*. 2005;84:96-103.
- JONES D, COLLINS MD. Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods. En Sneath PHA, Miari NS, Sharpe ME, Holt JG. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams y Wilkins, Baltimore. 1986;2:1261-1434.
- KACÁNIOVÁ M, CHLEBO R, KOPERNICKY M, TRAKOVICKÁ C. Microflora of the Honeybee Gastrointestinal Tract. *Folia Microbiol*. 2004;49(2):169-171.
- KANDLER O, WEISS N. Regular, Nonsporing, Gram-Positive Rods. En Sneath PHA, Miari NS, Sharpe ME, Holt JG. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams y Wilkins, Baltimore; 1986;2:1208-1260.
- KRIEG NR, HOLT JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William y Wilkins. Baltimore; 1984;1:784.
- MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. *Brock Biología de los microorganismos*. 8ª edición. Prentice Hall. Madrid; 2000:986.
- MICHENER CHD. *The Bees of the World*. The Johns Hopkins University Press, London; 2000:913.

- MUNDO MA, PADILLA-ZAKOUR OI, WOROBO RW. Growth Inhibition of Foodborne Pathogens and Food Spoilage Organisms by Select Raw Honey. Int J Food Microbiol. 2004;97:1-8.
- PALLERONI NJ. *Pseudomonadaceae*. En: KRIEG NR, HOLT JG. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. William y Wilkins. Baltimore; 1984;1:141-219.
- RAMÍREZ MC, SANTOS RA, ISEA FR. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. Rev Fac Agron (LUZ). 2000;17:217-225.
- ROUBIK WD. Ecology and Natural History of Tropical Bees. Cambridge University Press. New York; 1989;514.
- SCHLEIFER KH. Gram-Positive Cocci. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams y Wilkins, Baltimore; 1986;2:999-1103.
- SEELEY TD. Honeybee Ecology. Princeton University Press. Princeton. 1985;201.
- SNOWDON JA, CLIVER DO. Microorganisms in Honey. Int J Food Microbiol. 1996;31:1-26.
- VALENCIA H. Manual de prácticas de microbiología básica. Notas de Clase. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Unibiblos, 1 Edición, Bogotá; 2004.
- ZUCOLOTO FS, PENEDO CT. Physiological Effects of Mannose in *Scaptotrigona postica*. Bol Zool. 1977;2:129-134.