



IBCIENCIAS
IBCIENCIAS
IBCIENCIAS



IBCIENCIAS



www.biociencias.unach.mx/ibciencias



Volumen 5 · Número 1 · Junio · 2022

Revista científica electrónica

Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México



Volumen 5 · Número 1 · Junio · 2022

www.biociencias.unach.mx/ibciencias

IBCIENCIAS, volumen 5, número 1, Enero-Junio 2022, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, www.biociencias.unach.mx/ibciencias, ibciencias.revista@gmail.com. Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2019-053014202300-01, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

CONTENIDO

Junio de 2022 / Vol 5 / Num 1

- 1-9** ***Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae): promotora de la salud vegetal.** Benjamín Moreno-Castillo, Humberto Ortiz-Barrios, Miguel Salvador- Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya.
- 10-17** **Enzimas del buche de *Melipona beecheii* en el proceso de conversión de néctar a miel.** Julieta Grajales-Conesa, Albert Antonio Díaz-Barrios, Víctor Jesús Albores-Flores, José Alfonso López-García.



Volumen 5 · Número 1 · Junio · 2022

www.biociencias.unach.mx/ibciencias



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Serratia marcescens (Enterobacteriaceae): promotora de la salud vegetal

Benjamín Moreno-Castillo, Humberto Ortiz-Barrios, Miguel Salvador-Figueroa, María de Lourdes Adriano-Anaya*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

Desde su descubrimiento en 1823, *Serratia marcescens* ha sido una de las bacterias más estudiadas y que ha acaparado mayormente la atención de la investigación científica por su variado metabolismo secundario, mismo que le ha conferido un amplio potencial como promotor de la salud vegetal. Una de las principales limitantes para su uso generalizado como agente de biocontrol (ABC) de plagas y enfermedades en la agricultura, es la capacidad de generar infecciones en pacientes inmunocomprometidos, lo cual eventualmente podría representar riesgos para la salud humana y organismos no blanco. Actualmente, el reto de la investigación es detectar cepas inocuas de *S. marcescens* que podrían ser utilizadas como ABC para complementar los programas de protección vegetal, o bien, potencializar la actividad antagonista de sus metabolitos secundarios mediante técnicas de bioingeniería, evitando con ello la liberación intencional de bacterias libres al ambiente. El presente trabajo hace una revisión de los ejemplos y posibles usos que podría tener la bacteria como ABC de plagas y enfermedades, así como complemento para la nutrición vegetal.

Palabras clave:

Antagonismo
Biocontrol
Metabolitos secundarios
Quitinasas
Prodiosina

Keywords:

Antagonism
Biocontrol
Secondary metabolites
Chitinases
Prodiosin

Serratia marcescens (Enterobacteriaceae): plant health promoter

Abstract

Since its discovery in 1823, *Serratia marcescens* has been one of the most studied bacteria and that has increasingly gathered the attention of the scientific research, due to its rich secondary metabolism that confers a great potential as plant health promoter. One of the main handicaps of its generalized use as biocontrol agent (BCA) of pest and pathogens in agriculture, is its pathogenicity for immunocompromised patients, which might eventually represent risks for human health and non-target organisms in the field. The current research challenges are to detect non-pathogenic strains of *S. marcescens* with potential as BCA and to complement plant protection programs, or potentialize the antagonistic activities of its secondary metabolites by bioengineering approaches, avoiding the intentional delivery of free bacteria into the environment. This work reviews the uses and possible applications of the bacteria as BCA of pest and pathogens, as well as a complement for plant nutrition.

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
maria.adriano@unach.mx

1. Introducción

Cuando el hombre deja de ser recolector y cazador (nómada) y se convierte en sedentario (periodo de 9000 - 3000 a.C.), empieza a cultivar y producir su propio alimento (plantas y animales), dando paso con ello a un acontecimiento que marcó el rumbo de la historia de la raza humana: la agricultura. Con el paso del tiempo, empezaron a aparecer plagas insectiles y enfermedades que afectaban a los cultivos y cosechas, originando así la era de la protección vegetal, la cual se hacía de manera empírica pero que con el tiempo fue mejorando (Zizumbo y García, 2008). En México comienza de manera oficial a partir de 1900 con la creación de la Comisión de Parasitología Agrícola a nivel nacional, quienes empezaron a realizar estudios sobre las plagas importantes de esa época: la langosta del maíz (Orthoptera), picudo del algodón, picudo del chile (Coleoptera), mosca mexicana de la fruta (Diptera), tizón tardío de la papa (Peronosporales), ojo de gallo (Agaricales), mancha de hierro (Capnodiales), hormiga arriera (Hymenoptera) y conchuela del frijol (Coleoptera), información que se divulgaba a través de los Boletines que publicaba periódicamente esta Comisión (Contreras-Servín, 2022).

Sin embargo, a partir de la revolución verde (décadas de los 40-50's) se da un cambio importante en la protección vegetal con el surgimiento de los insecticidas organoclorados (DDT, Aldrín, Toxafeno, etc.), los cuales cambiaron el paradigma de la protección de los cultivos con todo y sus "pros y contras" (Ceccon, 2008; Contreras-Servín, 2022). Si bien es cierto que se lograron avances importantes en la capacidad productiva de los cultivos y se incrementaron las cosechas (cereales y fabáceas) en esa etapa de posguerra, se empezaron a notar efectos colaterales con el uso de los insumos agrícolas sintéticos utilizados para la nutrición y protección de los cultivos, así como efectos en el suelo derivados de la mecanización del campo y que se convirtieron posteriormente en una preocupación mundial (Contreras-Servín, 2022; Restrepo, 1988): contaminación ambiental, erosión y pérdida de productividad de los suelos, pérdida de biodiversidad, generación de resistencia, bioacumulación en organismos no blanco y riesgos en la salud humana (Altieri y Nicholls, 2000; 2013; Waliszewski et al., 2002).

Hoy día se menciona continuamente que el reto es garantizar la seguridad alimentaria para los 9 mil millones de habitantes que habrán en el planeta para el 2050, sin embargo, actualmente se produce suficiente alimento y habrá comida para todos hacia mediados de siglo, siempre y cuando se atiendan los problemas de la distribución desigual de alimentos en el mundo, eliminar el mal hábito del desperdicio de alimentos y cambiar los modelos de consumo y producción agrícola convencional altamente degradantes de los recursos naturales disponibles (Altieri y Nicholls, 2013). La actual pandemia Covid-19 vino a demostrar que la salud ecológica-ambiental, la salud animal y la salud humana están estrechamente vinculadas y que los sistemas actuales de producción de alimentos globales e industrializados (similares a los de la revolución verde) son frágiles y pueden conducir a

una crisis alimentaria, sanitaria y ambiental (Altieri y Nicholls, 2020). Por esta razón, se deben fomentar estrategias o prácticas agrícolas ambientalmente amigables en cuanto a la protección vegetal y la nutrición de los cultivos, mismas que garanticen un bajo impacto en los agroecosistemas y coadyuven al mantenimiento de los recursos naturales para las futuras generaciones (Ramírez et al., 2004).

El control biológico de plagas y enfermedades ha demostrado ser una herramienta útil para la protección vegetal, eficaz y de bajo impacto ambiental para los ecosistemas (Bale et al., 2008; Feditchkina, 2014; Nicholls, 2008; Swiontek et al., 2014; van Lenteren et al., 2006; van Lenteren, 2012). El control biológico o biocontrol se define en su forma más completa como el uso de los enemigos naturales (depredadores, parasitoides o microorganismos antagonistas) para suprimir o causar un decremento en las poblaciones de plagas o de fitopatógenos, detrimento que puede ser causado vía antibiosis, parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, o bien, vía generación de inmunidad vegetal o reacciones de resistencia (Cook y Baker, 1983; Eilenberg et al., 2001; Köhl et al., 2019; Pandit et al., 2022). Sin embargo, aún prevalece la falta de adopción de estas biotecnologías para el control de plagas y enfermedades, lo que posiblemente esté relacionado con 1) el escepticismo en la efectividad de los agentes de biocontrol (ABC), la cual no es tan espectacular como los plaguicidas químico-sintéticos, 2) el desconocimiento del uso de estos agentes biológicos, y 3) la alta dependencia hacia el uso de los agroquímicos y fertilizantes convencionales (van Lenteren, 2012).

El presente trabajo realiza una recopilación de información sobre *Serratia marcescens*, una bacteria ubicua en la naturaleza que ha sido ampliamente estudiada como ABC de plagas y enfermedades, así como biofertilizante y promotor de crecimiento vegetal. A pesar de sus bondades, tiene el inconveniente de pertenecer al grupo de las enterobacterias y causar enfermedades nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (Grimont y Grimont, 2006), lo cual puede llegar a representar una desventaja para su empleo como ABC en la protección vegetal de cultivos agrícolas (Konecka et al., 2019). Sin embargo, se han identificado cepas de *S. marcescens* no patogénicas para humanos, lo cual favorece su utilización como ABC (Purkayastha et al., 2018).

2. Generalidades de *Serratia marcescens*

El género *Serratia* de la familia Enterobacteriaceae, comprende varias especies de bacterias Gram negativas que se caracterizan en su mayoría por producir un pigmento no difusible e insoluble en agua llamado prodigiosina (Grimont y Grimont, 1978; Williamson et al., 2005). Al presente se mencionan 10 especies dentro del género *Serratia* que se han aislado de una variedad de hábitats, como habitantes del cuerpo de pequeños mamíferos, invertebrados (insectos), de agua, suelo, plantas y humanos (Grimont y Grimont, 2006). La especie *S. marcescens* Bizio (1823), anteriormente conocida como *Bacillus prodigiosus* (Breed y Breed, 1924), se considera la especie "tipo" del género y ha sido

ampliamente estudiada tanto desde el punto de vista clínico como del punto de vista aplicado para la obtención de subproductos o materias primas útiles al hombre. En 1823, el químico Bartolomeo Bizio originario de Padua Italia, descubrió en polenta (alimento tradicional del norte de Italia) y en piezas de pan pequeñas coloraciones rojas, de donde aisló, describió y nombró por primera vez al microorganismo responsable de ese fenómeno como *S. marcescens*. “*Serratia*” en honor al Físico Italiano Serafino Serrati y “*marcescens*” por el término del Latín que indica “descomposición”, puesto que se dio cuenta que el pigmento rojo se deterioraba fácilmente. Algunos hechos similares ocurridos en otros lugares de Europa, fueron observados en imágenes religiosas y alimentos, lo cual fue incluso relacionado con creencias teológicas y sobrenaturales (Grimont y Grimont, 1978; Soenens e Imperial, 2020).

2.1. Modos de acción de *S. marcescens*

La manera en que *S. marcescens* ejerce acción antagonica sobre otros organismos se debe principalmente a su variado metabolismo secundario (antibiosis), así como su capacidad de colonizar una variedad de hábitats que la hacen ser una excelente competidora ante otros microorganismos, además de su rápida velocidad de multiplicación en condiciones favorables (Grimont y Grimont, 2006; Petersen y Tisa, 2013; Soenens e Imperial, 2020). Asimismo, se ha demostrado que la bacteria es capaz de inducir resistencia sistémica contra patógenos y promover el crecimiento vegetal (Jeong et al., 2015). Adicionalmente, se ha demostrado su capacidad de establecerse como endófito, lo cual le podría dar mayor capacidad de sobrevivencia en el campo y ejercer acción antagonica desde el interior de los tejidos vegetales (Mohan et al., 2011; Tan et al., 2015). El análisis, comparación y secuenciación de su genoma, ha permitido detectar la presencia de diferentes genes que le proporcionan múltiples cualidades y atributos como potencial ABC (Li et al., 2015).

2.2. Metabolismo secundario de *S. marcescens*

Se considera que una de las principales cualidades que confieren a *S. marcescens* el potencial como ABC de plagas y fitopatógenos es su eficiente maquinaria quitinolítica, la cual utiliza y activa para degradar la quitina estructural de las paredes celulares de los hongos y el exoesqueleto de los artrópodos fitófagos (Adams, 2004; Latgé, 2007, 2010). La producción de quitinasas se ha correlacionado con el éxito de los agentes microbianos para el biocontrol de plagas y enfermedades (Herrera-Estrella y Chet, 1999). Esta maquinaria enzimática ha sido ampliamente caracterizada en *S. marcescens*, la cual consta de tres quitinasas (ChiA, ChiB, ChiC) (Suzuki et al., 2002), una quitobiasa (Drouillard et al., 1997; Toratani et al., 2008) y una posible proteína ligada a quitina (CBP21) (Suzuki et al., 1998) que actúan de manera sinérgica en la degradación del biopolímero (Gutiérrez-Román et al., 2014; Horn et al., 2006).

La maquinaria quitinolítica de *S. marcescens* puede ser inducida en el laboratorio utilizando medios mínimos (M9)

adicionados con una fuente de quitina (coloidal principalmente) como única fuente de carbono (Singh et al., 2008). Aunque no es muy común, la inducción también se puede hacer usando directamente las paredes celulares o micelio del patógeno como medio de cultivo (Ordentlich et al., 1988). La naturaleza de esta maquinaria enzimática de *S. marcescens* puede variar con la cepa. Normalmente se han reportado quitinasas con masas moleculares entre 50-98 kDa para esta bacteria, pero Ruiz-Sánchez et al. (2005) detectaron una quitinasa (N-acetil-glucosaminidasa) de *S. marcescens* cepa NIMA con dos isoformas (180.5 y 180.8 kDa) y con puntos isoeléctricos de 5 y 8.1, respectivamente. Tras detectar estas masas moleculares atípicas, los autores evaluaron y descartaron la glicosilación de estas isoformas (prueba timol-ácido sulfúrico). Las modificaciones pos-traduccionales como la glicosilación pueden generar migraciones erráticas de las enzimas en geles SDS-PAGE, tal como fue reportado en quitinasas >180 kDa de *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 (Moreno-Castillo et al. 2016). Gal et al. (1998) encontraron que una quitinasa de 52 kDa originaba otra de 35 kDa mediante la acción de una proteasa, modificación postraducciona que tuvo lugar en el sobrenadante de cultivo de *S. marcescens* KCTC2172, lo que da cuenta de la versatilidad que puede existir de las maquinarias quitinolíticas dependiendo de la cepa bajo estudio.

Asimismo, *S. marcescens* produce otros metabolitos secundarios como la prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodiginina), un pigmento rojo con propiedades antifúngicas y antibióticas (Williamson et al., 2005; Figura 1) producido bajo regulación *quorum sensing* (*qs*) (Thomson et al., 2000), que en sinergia con las quitinasas incrementa su actividad antagonica (Akutsu et al., 1993; Gutiérrez-Román et al., 2015; Someya et al., 2000, 2001).

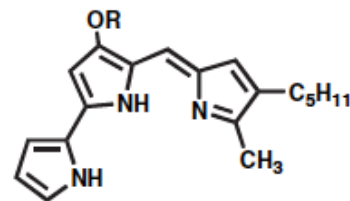


Figura 1. Estructura química de la prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodiginina). Tomado de Williamson et al. (2005).

Adicionalmente, *S. marcescens* también puede producir biosurfactantes, compuestos volátiles y otros grupos de compuestos bioactivos con propiedades antifúngicas (Soenens e Imperial, 2020). Además de la prodigiosina (pigmento característico del género) otro metabolito secundario muy importantes en *S. marcescens* es el carbapenem (1-carbapen-2-em-3-ácido carboxílico, Figura 2), regulado también por *qs*, ambos producidos en la fase exponencial tardía del crecimiento celular e influenciado por la disponibilidad de fósforo en el medio y otras condiciones (Slater et al., 2003). Otro compuesto antifúngico producido por la bacteria es la oocidina A (grupo de los poliquétidos, Figura 2), una lactona

macrocíclica clorada que ha demostrado propiedades antagonicas sobre patógenos del grupo de los oomicetos, principalmente *Pythium ultimum*, *Phytophthora parasitica*, *P. cinnamomi* y *P. citrophora* (Strobel et al., 1999).

Los compuestos volátiles (VOC) son un grupo de metabolitos secundarios bacterianos de propiedades antifúngicas (Kai et al., 2009; Pandit et al., 2022). El VOC sodorifeno (Figura 2) fue descubierto en *Serratia plymuthica* cepa 4Rx13 y aunque aún se desconocen sus propiedades y relevancia biológica, se presume sea un compuesto antimicrobiano que podría estar presente en algunos aislamientos de *S. marcescens* (Weise et al., 2014).

Los compuestos conocidos como “serrawettins” son metabolitos secundarios que se han identificado dentro del género *Serratia* y que han ganado especial interés (Figura 2). Los *serrawettins* son biosurfactantes no iónicos que produce *S. marcescens* para modificar la hidrofobicidad de la superficie celular y mejorar su adhesión a diferentes superficies en la naturaleza, así como mejorar la superficie de crecimiento en ambientes pobres en nutrientes (Matsuyama et al., 2011). El antibiótico altiomicina (Figura 2) también es biosintetizado por *S. marcescens*, aunque inicialmente se detectó en *Mixobacteria* sp. y en *Streptomyces althioticusim*, residentes naturales de suelo. Este compuesto se le ha relacionado con la capacidad de inhibir otras bacterias y conferir a *S. marcescens* una mayor ventaja competitiva para ocupar y colonizar nuevos hábitats para crecer (Gerc et al., 2012). Finalmente, *S. marcescens* posee un mecanismo de secreción de proteínas y compuestos elicitors que tienen que ver con su capacidad competitiva ante otros microorganismos. Este sistema de secreción conocido como Sistema de Secreción Tipo 6 (T6SS) es muy común en Gram negativas y es determinante en la capacidad de virulencia en bacterias patógenas. Se trata de un sistema altamente eficiente para secretar de manera controlada y selectiva los metabolitos extracelulares antimicrobiales y hacer blanco directo sobre los competidores (Murdoch et al., 2011; Trunk et al., 2018).

3. *S. marcescens* como biofungicida

Varios trabajos han demostrado el efecto antagonico de *S. marcescens* contra una variedad de hongos fitopatógenos residentes de suelo y foliares, tanto *in vitro* como *in planta*, lo que principalmente se ha relacionado con su actividad quitinolítica (y otras enzimas micolíticas), además de la producción de prodigiosina. Contra *Sclerotinia minor* causante de la pudrición basal en lechuga, El-Tarabily et al. (2000) encontraron una reducción significativa en el crecimiento *in vitro*, cero incidencia de la enfermedad en plantas de invernadero y una alta capacidad de colonización de la rizósfera. Por otro lado, los metabolitos extracelulares obtenidos en medio LB adicionado con quitina coloidal de *S. marcescens* B2 aislada del filoplano de plantas de tomate, fueron efectivos para inhibir *in vitro* varias especies de *Botrytis*. El efecto antagonico se debió a la actividad quitinolítica del sobrenadante sobre las hifas de los hongos (Akutsu et al., 1993). Posteriormente, Someya et al. (2001)

reportan sinergismo en la actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* entre la prodigiosina y las quitinasas extracelulares de esta misma cepa (B2). Zarei et al. (2011) purificaron parcialmente una quitinasa de *S. marcescens* B4A, la cual mostró actividad antifúngica sobre las hifas de *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris* sp, *Alternaria raphani*, *A. Brassicicola*, actividad que se visualizó con cambios estructurales en las paredes celulares de los hongos.

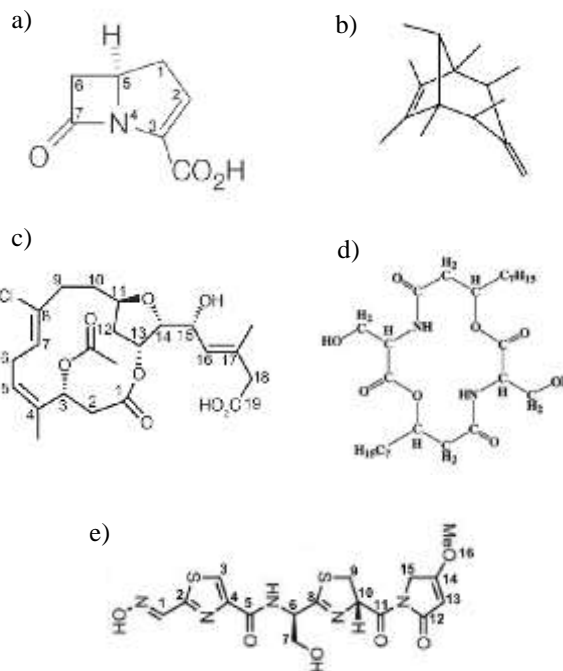


Figura 2. Otros metabolitos secundarios producidos por *S. marcescens*: a) carbapenem, b) sodorifen, c) oocidina A, d) serrawettin W1, e) altiomicina. Tomado de Soenens e Imperial (2020).

Riveros et al. (2003) encontraron que el sobrenadante de cultivo (libre de células) de *S. marcescens* (R1) cultivada en caldo nutritivo inhibió la germinación de ascosporas y el crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra del banano. Por su parte, Gutiérrez-Román et al. (2015) determinaron una inhibición *in vitro* de 100% en la germinación de ascosporas y elongación del tubo germinativo de *M. fijiensis*, así como 91% en el crecimiento micelial con la inoculación de una suspensión bacteriana y prodigiosina de *S. marcescens* CFFSUR-B2. Aunque esta enfermedad foliar es la más importante en la producción de banano, actualmente existe una amenaza en toda América Central por la llegada del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* sp. cubense, FOC4), patógeno altamente destructivo causante de marchitez vegetal y que ha prendido las alarmas en las plantaciones de bananos triploides (*Musa AAA*) en México y Centroamérica. Sobrenadantes de cultivo de la cepa *S. marcescens* ITBB B5-1 mostraron alta capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la formación de conidios, reducción del crecimiento micelial y daños estructurales en las paredes

celulares fúngicas de FOC4, atribuidas a la acción quitinasa y glucanasa de estos sobrenadantes. En ensayos de invernadero la bacteria redujo la severidad de la enfermedad en 78% mientras que en el campo se observó 70% de control (Tan et al., 2015).

En plantas de té (*Cammelia sinensis*) el tratamiento de raíces con una formulación base talco de *S. marcescens* ETR17 mostraron menores niveles de incidencia de *Rhizoctonia solani* que las plantas control. Asimismo, se demostró que la cepa fue capaz de producir sideróforos, compuestos de bajo peso molecular que secuestran al Fe, haciéndolo inaccesible para los patógenos (Purkayastha et al., 2018). Parani et al. (2011) aislaron de suelo la cepa SR₁ de *S. marcescens*, la cual mostró alta capacidad quitinolítica y cuyo sobrenadante de cultivo mostró porcentajes de inhibición *in vitro* superiores a 86% contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Sclerotium rolsfii* y *Rhizoctonia solani*.

En ensayos de invernadero, los metabolitos extracelulares de la cepa *S. marcescens* R-35 aislada de rizósfera de *Citrus limonia*, redujeron a 50% aproximadamente la incidencia de la gomosis causada por *Phytophthora parasitica*, mientras que *in vitro* el crecimiento micelial fue inhibido en 40% (Queiroz y de Melo, 2006). En estos ensayos se observó que los metabolitos extracelulares o sobrenadante de cultivo, lisaron las oosporas de *P. parasitica* y el micelio se coloreó de rojo debido a la prodigiosina bacteriana tal y como se observó en ascosporas de *M. fijiensis*. Se piensa que las quitinasas provocan un desbalance de la pared celular que facilita la entrada de los metabolitos al interior de las hifas del hongo (Gutiérrez-Román et al., 2015).

El gen *SmchiC* proveniente de la cepa Bar86 de *S. marcescens* fue insertado en plantas de tabaco para sobreexpresar la quitinasa bacteriana, encontrándose que las plantas modificadas fueron altamente resistentes a *Botrytis cinerea* y a larvas del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Navarro-González et al. 2019).

Aunque la actividad biofungicida de *S. marcescens* se ha asociado principalmente a sus quitinasas, la prodigiosina puede jugar un rol mayoritario en esta actividad antifúngica. La prodigiosina mostró mayor capacidad inhibitoria *in vitro* sobre *Didymella applanata* (tizón espuela de la frambuesa) que las quitinasas producidas por la cepa *S. marcescens* HY⁻ (Duzhak et al., 2012). El extracto etanólico de *S. marcescens* N4-5 aplicado como tratamiento de semillas, controló de manera efectiva el *damping-off* en pepino causado por *Pythium ultimum*, el cual contenía principalmente prodigiosina y el biosurfactante serrawettin W1 producidos por la bacteria (Roberts et al., 2021).

4. *S. marcescens* como bioinsecticida

La capacidad bioinsecticida de *S. marcescens* ha sido estudiada desde hace varias décadas y también se ha correlacionado con su capacidad de degradar la quitina contenida en el exoesqueleto de los insectos y artrópodos en general (Ruíz-Sánchez et al., 2003). Uno de los trabajos pioneros consistió en el suministro de una quitinasa

extracelular de la bacteria sobre larvas de *Galleria melonella*, registrando alta toxicidad y mortalidad (Lyvenko, 1976). Mohan et al. (2011) sometieron una suspensión celular de la cepa SRM (MTTC 8708) de *S. marcescens* (6×10^6 UFC mL⁻¹) suministrada en una dieta artificial para la cría en laboratorio de *Helicoverpa armigera*, causando mortalidad de 66% así como retrasos en el desarrollo de las larvas.

Al igual que en los humanos, la microbiota intestinal de los insectos juega un papel clave de defensa, la cual puede prevenir las infecciones por *S. marcescens*. Se encontró que la microbiota de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* fue la responsable de evitar la mortalidad de los insectos después del suministro de *S. marcescens* (Dillon et al., 2005). Sin embargo, en el psílido australiano de los cítricos *Diaphorina citri* (agente causal del HLB, Huanglongbing de los cítricos), se observó que la mortalidad causada por *S. marcescens* en ninfas de quinto estadio ocurrió por el detrimento causado por la bacteria en la microbiota natural e intestinal del insecto (Hu et al., 2018). Por otro lado, cepas bacterianas fueron aisladas del homocelo de individuos muertos de *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae), plaga importante que se alimenta de las raíces en plantaciones de maíz. Las diferentes cepas fueron identificadas como *S. marcescens* y cuando se suministraron vía oral o por inyección en larvas de *P. plancardii* causaron comportamientos anti alimentarios y mortalidad, principalmente la cepa Sm81. Una proteasa de 50 kDa se detectó como posible responsable de esta mortalidad larval, la cual podría tener aplicaciones biotecnológicas para el control de esta plaga agrícola (Pineda-Castellanos et al., 2015).

Mediante ingeniería genética genes de la quitinasa ChiA de *S. marcescens* se han usado para sobreexpresar esta enzima y complementar e incrementar la actividad tóxica de la endotoxina proteica CryIC de *Bacillus thuringiensis*, usando como hospedero *E. coli*. Las proteínas sobreexpresadas y suministradas en combinación vía ingestión sobre larvas neonatas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), mostraron efecto sinérgico en la mortalidad larval (Regev et al., 1996). Mismos efectos *in vitro* encontraron Downing et al. (2000) al mezclar y suministrar la combinación de ambas proteínas heterólogas en larvas de *Eldana saccharina* (barrenador de la caña de azúcar).

En insectos de importancia médica como *Aedes aegypti* también se ha demostrado el efecto insecticida de *S. marcescens* (cepa VA), donde la prodigiosina causó efectos tóxicos sobre las larvas, mientras que el efecto sobre adultos fue atribuido a otros metabolitos secundarios de la bacteria (Heu et al., 2021).

5. *S. marcescens* como bionematicida y bioacaricida

También se ha demostrado el efecto antagónico de *S. marcescens* como bionematicida. El pigmento rojo prodigiosina ha demostrado tener *in vitro* efectos tóxicos en juveniles del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* (Kassab et al., 2017; Mohamd et al., 2020), *Radophulus similis* (Rahul et al., 2014), *Nacobus celatus* (Gómez-Valdéz et al.,

2022), *Caenorhabditis elegans*, *Heterodera schachtii*, fitopatógenos de alta importancia económica en una variedad de cultivos agrícolas (Habash et al., 2020). Asimismo, las quitinasas ChiA, ChiB y ChiC1 de *S. marcescens* GEI (aislada del intestino de obreras de la abeja china *Apis cerana*) y sobre expresadas en *E. coli*, causaron 100% de mortalidad en hembras del ácaro *Varroa destructor*, sin afectar a las obreras de *Apis mellifera* cuando fueron asperjadas con la solución enzimática (Tu et al., 2010).

6. *S. marcescens* como promotor de crecimiento vegetal, inductora de resistencia y biofertilizante

Se estima que las plantas han co-evolucionado con los microorganismos desde hace 4,500 millones de años (Delaux y Schornack, 2021), aunque la evidencia de estas asociaciones se confirmaron hace poco más de 300 años con el perfeccionamiento del microscopio, siendo las rizobias fijadoras de N las primeras en ser observadas (Harman and Uphoff, 2019). Las interacciones planta-microorganismo son variadas y las que ocurren especialmente en la rizósfera, son determinantes para el crecimiento, salud y productividad vegetal, así como para la fertilidad del suelo. Aquellos microorganismos que establecen asociaciones estrechas o simbióticas con las plantas, como las bacterias endófitas, son los que promueven con mayor éxito el crecimiento vegetal (de Souza et al., 2015). La fijación simbiótica de N, la conversión de formas insolubles no aprovechables de N, P y K a formas asimilables, producción de fitohormonas, producción de la enzima ACC desaminasa e inducción de tolerancia o resistencia vegetal a estrés biótico o abiótico, también les confiere el rol como promotores del crecimiento vegetal (Kandel et al., 2017) y como biofertilizantes (de Souza et al., 2015).

S. marcescens además de ser residente de rizósfera y promover el crecimiento vegetal en plantas de té *Camellia sinensis* (Purkayastha et al., 2018), también ha sido aislada como endófito radicular en varias especies vegetales. Las bacterias diazotróficas residentes de los nódulos de leguminosas, han sido de las bacterias más estudiadas. Sin embargo, esta simbiosis también puede ocurrir en otras plantas y no necesariamente en raíces. La cepa endófitica de *Serratia* sp. aislada de arroz, mostró capacidad de ser fijadora de N y colonizar porciones de tallo y hojas (Sandhiya et al., 2005). La cepa endófitica *S. marcescens* IRBG500 aislada de arroz, mostró habilidad para fijar N, estimular el crecimiento de las plantas y colonizar raíces, tallos y hojas del arroz (Gyaneshwar et al., 2001). La cepa UPM39B3 de *Serratia* sp. aislada como endófito radicular en plantas de *Musa* sp., mostró elevado nivel de estimulación del crecimiento de plántulas de banano (Ting et al., 2008).

Los microorganismos también son capaces de inducir resistencia vegetal a las infecciones por patógenos. Los avances en la biología molecular y conocimientos de los genomas microbianos han permitido dilucidar las capacidades de los microorganismos para la inducción de resistencia y otras propiedades relacionadas con el biocontrol. La

secuenciación del genoma de *S. marcescens* 90-166 reveló genes claves relacionados con la producción de metabolitos relacionados con la regulación e inducción de resistencia vegetal, como son el compuesto 2,3-butanediol, el sideróforo enterobactina y la homoseril-lactona mediador del *qs*; además se detectó el gen productor del ácido salicílico (AS) y el regulador transcripcional BsdA, ambos relacionados con la activación de la inducción de resistencia mediada por AS (Jeong et al., 2015). Previo al conocimiento de su genoma, ya se había demostrado la capacidad de la cepa 90-166 para inducir resistencia en pepino contra la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. (Liu et al., 1995).

Por otro lado, además de inducir resistencia y el crecimiento vegetal, la cepa *S. marcescens* CDP-13 fue positiva para ACC desaminasa, la cual reduce los niveles del etileno (hormona del estrés vegetal), además de tener capacidad de solubilizar P, producir sideróforos, producir ácido indol-acético, fijar N y producir amonio, además de incrementar la tolerancia al estrés abiótico por salinidad en plantas de trigo (Singh y Jha, 2016). La cepa CTM50650 de *S. marcescens* mostró gran eficiencia en la solubilización de diferentes formas de P (roca fosfórica, fosfato de calcio, fosfato tricálcico e hidroxapatita) (Ben Farhat et al., 2009). La cepa *S. marcescens* EB 67 con habilidad para solubilizar el P, incrementó significativamente la biomasa en plantas de maíz y aplicada como inoculante en la semilla incrementó el rendimiento del grano en 85% comparado con plantas no tratadas, además de permanecer viva en el suelo hasta por 96 días después de la siembra (Hameeda et al., 2008).

7. Conclusión

Serratia marcescens ha sido de las bacterias más estudiadas debido a su variado metabolismo secundario, el cual ha acaparado especial interés para la obtención de moléculas bioactivas. Este variado metabolismo le confiere un amplio potencial como agente de biocontrol (ABC) de plagas y enfermedades agrícolas, bien sea como biofungicida, bioinsecticida, bionematicida, bioacaricida, biofertilizante y promotor de crecimiento e inductor de resistencia vegetal. No obstante, de su potencial como ABC y lo fácil que resulta su manejo y cultivo en laboratorio, el reto a futuro es la selección de cepas inocuas para el ambiente, al hombre y organismos no blanco, además de tener la capacidad de adaptarse a las condiciones ambientales específicas en donde pretenda utilizarse como bioplaguicida.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

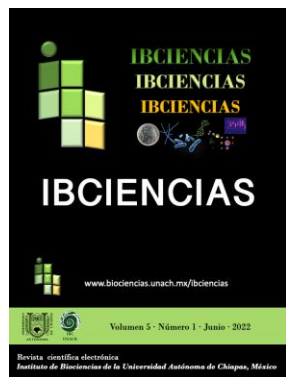
Referencias

- Adams DJ. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150(7): 2029–2035.
- Akutsu K, Hirata A, Yamamoto M, Hirayae K, Okuyama S, Hibi T. 1993. Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia*

- marcescens* B2 isolated from tomato phylloplane. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 59(1): 18–25.
- Altieri MA, Nicholls CI. 2000. Agroecología: teoría y práctica para una agricultura sustentable. 1ª Edición. México D.F.: PNUMA.
- Altieri MA, Nicholls CI. 2020. Agroecology and the emergence of a post COVID-19 agriculture. *Agriculture and Human Values* 37(3): 525–526.
- Altieri MA, Nicholls, CI. 2013. Agroecología: Única esperanza para la soberanía alimentaria y la resiliencia socioecológica. *Agroecología* 7(2): 65–83.
- Bale JS, van Lenteren JC, Bigler F. 2008. Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363(1492): 761–776.
- Ben Farhat M, Farhat A, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, Antoun H, Bejar S, Chouayekh, H. 2009. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Archives of Microbiology* 191(11): 815–824.
- Breed RS, Breed ME. 1924. The type species of the genus *Serratia*, commonly known as *Bacillus prodigiosus*. *Journal of Bacteriology* 9(6): 545–557.
- Ceccon E. 2008. La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias* 1(91): 21–29.
- Contreras-Servin C. 2022. Historia de la Sanidad Vegetal en México de 1900 a 1963. La Comisión de Parasitología Agrícola y El Departamento de Parasitología. *Revista Inclusiones* 9: 1–23.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. *American Phytopathological Society*. St. Paul, Minnesota.
- de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38(4): 401–419.
- Delaux PM, Schornack S. 2021. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science* 371(6531): eaba6605.
- Dillon RJ, Vennard, CT, Buckling A, Charnley AK. 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters* 8(12): 1291–1298.
- Downing KJ, Leslie G, Thomson JA. 2000. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7): 2804–2810.
- Drouillard S, Armand S, Davies GJ, Vorgias CE, Henriessat, B. 1997. *Serratia marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase utilizing substrate acetamido group participation. *Biochemical Journal* 328: 945–949.
- Duzhak AB, Panfilova ZI, Duzhak TG, Vasyunina EA, Shternshis MV. 2012. Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. *Biochemistry* 77(8): 910–916.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46(4): 387–400.
- El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithamparam K, McKenna F, Hardy GESJ. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49(5): 573–583.
- Feditchkina E. 2014. The promise of biological control for sustainable agriculture: a stakeholder-based analysis. *Journal of Science Policy and Governance* 5(1): 1–13.
- Gal SW, Choi JY, Kim CY, Cheong YH, Choi YJ, Lee SY, Bahk JD, Cho MJ. 1998. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 160(1): 151–158.
- Gerc AJ, Song L, Challis GL, Stanley-Wall NR, Coulthurst SJ. 2012. The insect pathogen *Serratia marcescens* Db10 uses a hybrid non-ribosomal peptide synthetase-polyketide synthase to produce the antibiotic althiomycin. *PLoS One* 7(9): e44673.
- Gomez-Valdez, L, Rondan-Dueñas JC, Andrade AJ, Del Valle EE, Doucet ME, Lax P. 2022. *In vitro* and *in vivo* nematicidal activity of prodigiosin against the plant-parasitic nematode *Nacobbus celatus*. *Biocontrol Science and Technology* 32(6): 741–751.
- Grimont F, Grimont P. 2006. The Genus *Serratia*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds.). Springer New York. Pp. 219–244.
- Grimont PAD, Grimont F. 1978. The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology* 32(1): 221–248.
- Gutiérrez-Román MI, Dunn MF, Tinoco-Valencia R, Holguín-Meléndez F, Huerta-Palacios G, Guillén-Navarro K. 2014. Potentiation of the synergistic activities of chitinases ChiA, ChiB and ChiC from *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 by chitobiase (Chb) and chitin binding protein (CBP). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(1): 33–42.
- Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Dunn MF, Guillén-Navarro K, Huerta-Palacios G. 2015. Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *BioControl* 60(4): 565–572.
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183(8): 2634–2645.
- Habash SS, Brass HUC, Klein AS, Klebl DP, Weber TM, Classen T, Pietruszka J, Grundler FMW, Schleker ASS. 2020. Novel prodiginine derivatives demonstrate bioactivities on plants, nematodes and Fungi. *Frontiers in Plant Science* 11: 1–11.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* 163(2): 234–242.
- Harman GE, Uphoff N. 2019. Symbiotic root-endophytic soil microbes improve crop productivity and provide environmental benefits. *Scientifica* 2019: 1–25.
- Herrera-Estrella A, Chet I. 1999. Chitinases in biological control. *EXS* 87: 171–184.
- Heu K, Romoli O, Schönbeck JC, Ajenoë R, Epelboin, Kircher V, Houël E, Estevez Y, Gendrin M. 2021. The effect of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* on *Aedes aegypti* and its microbiota. *Frontiers in Microbiology* 12: 645701.
- Horn SJ, Sørbotten A, Synstad B, Sikorski P, Sørlië M, Vårum KM, Eijsink VGH. 2006. Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal* 273(3): 491–503.
- Hu W, Kuang F, Lu Z, Zhang N, Chen T. 2018. Killing effects of an isolated *Serratia marcescens* KH-001 on *Diaphorina citri*

- via lowering the endosymbiont numbers. *Frontiers in Microbiology* 9: 860.
- Jeong H, Kloepper JW, Ryu CM. 2015. Genome sequence of rhizobacterium *Serratia marcescens* strain 90-166, which triggers Induced Systemic Resistance and plant growth promotion. *Genome Announcements* 3(3): e00667-15.
- Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81(6): 1001–1012.
- Kandel SL, Joubert PM, Doty SL. 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5(4): 77.
- Kassab S, Eissa M, Badr U, Ismail A, Razik A, Soliman G. 2017. Nematicidal effect of a wild type of *Serratia marcescens* and its mutants against *Meloidogyne incognita* juveniles. *Egyptian Journal of Agronomy* 16: 95–114.
- Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10: 845.
- Konecka E, Mokracka J, Krzysińska S, Kaznowski A. 2019. Evaluation of the pathogenic potential of insecticidal *Serratia marcescens* strains to humans. *Polish Journal of Microbiology* 68(2): 185–191.
- Latgé JP. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* 12(7): 863–872.
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66(2): 279–290.
- Li P, Kwok AHY, Jiang J, Ran T, Xu D, Wang W, Leung FC. 2015. Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLoS One* 10(4): 1–22.
- Liu L, Kloepper JW, Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85(6): 695–698.
- Lyvenko O. 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 385–386.
- Matsuyama T, Tanikawa T, Nakagawa Y. 2011. Serrawettins and other surfactants produced by *Serratia*. In: Soberón-Chávez G. (ed.). *Biosurfactants, from genes to applications*. Springer, Berlin. Pp. 93–120.
- Mohamud OM, Hussein RAA, Ibrahim DSS, Badawi MH, Makboul HE. 2020. Effects of *Serratia marcescens* and prodigiosin pigment on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Middle East Journal of Agriculture Research* 243–252.
- Mohan M, Selvakumar G, Sushil SN, Bhatt JC, Gupta HS. 2011. Entomopathogenicity of endophytic *Serratia marcescens* strain SRM against larvae of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(11): 2545–2551.
- Moreno-Castillo B, Dunn MF, Navarro KG, Meléndez FH, Ortiz M H, Guevara SE, Palacios GH. 2016. Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(3): 1–12.
- Murdoch SL, Trunk K, English G, Fritsch MJ, Pourkarimi E, Coulthurst SJ. 2011. The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *Journal of Bacteriology* 193(21): 6057–6069.
- Navarro-González SS, Ramírez-Trujillo JA, Peña-Chora G, Gaytán P, Roldán-Salgado A, Corzo G, Lina-García L, Hernández-Velázquez VM, Suárez-Rodríguez R. 2019. Enhanced tolerance against a fungal pathogen and insect resistance in transgenic tobacco plants overexpressing an endochitinase gene from *Serratia marcescens*. *International Journal of Molecular Sciences* 20(14): 3482.
- Nicholls CI. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico 1a. Edición. Editorial Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia.
- Ordentlich A, Elad Y, Chet I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 78: 84–88.
- Pandit MA, Kumar J, Gulati S, Bhandari N, Mehta P, Katyal R, Rawat CD, Mishra V, Kaur J. 2022. Major biological control strategies for plant pathogens. *Pathogens* 11(2): 273.
- Parani K, Shetty GP, Saha BK. 2011. Isolation of *Serratia marcescens* SR1 as a source of chitinase having potentiality of using as a biocontrol agent. *Indian Journal of Microbiology* 51(3): 247–250.
- Petersen LM, Tisa LS. 2013. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian Journal of Microbiology* 59(9): 627–640.
- Pineda-Castellanos ML, Rodríguez-Segura Z, Villalobos FJ, Hernández L, Lina L, Nuñez-Valdez ME. 2015. Pathogenicity of isolates of *Serratia marcescens* towards larvae of the scarab *Phyllophaga blanchardi* (Coleoptera). *Pathogens* 4(2): 210–228.
- Purkayastha GD, Mangar P, Saha A, Saha D. 2018. Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLoS ONE* 13(2): e0191761.
- Queiroz BPV, de Melo IS. 2006. Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 448–450.
- Rahul S, Chandrashekar P, Hemant B, Chandrakant N, Laxmikant S, Satish P. 2014. Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*. *Natural Product Research* 28(17): 1399–1404.
- Ramírez A, Sánchez JM, García A. 2004. El desarrollo sustentable: interpretación y análisis. *Investigación* 6(21): 55–59.
- Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J, Zilberstein A. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied Environmental Microbiology* 62(10): 3581–3586.
- Restrepo I. 1988. Naturaleza muerta. Los plaguicidas en México. *Ciencias* 13: 40–50.
- Riveros AS, Giraldo CI, Gamboa A. 2003. Microbiological control of black leaf streak disease. In: Jacome L, Lepoivre P, Marín DH, Ortiz R, Romero R, Escalant JV. (eds.). *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*. INIBAP, Montpellier, France: Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, San José, Costa Rica. Pp. 287–296.
- Roberts DP, Selmer K, Lupitskyy R, Rice C, Buyer JS, Maul JE, Lakshman DK, DeSouza, J. 2021. Seed treatment with prodigiosin controls damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum*. *AMB Express* 11(1): 10.
- Ruiz-Sánchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE. 2005. Chitinases from *Serratia*

- marcescens* Nima. *Biotechnology Letters* 27(9): 649–653.
- Ruíz-Sánchez A, Cruz-Camarillo R, Salcedo-Hernández R, Corona, JE. 2003. *Serratia marcescens*: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *BioTecnología* 8(2): 31–37.
- Sandhiya, G. S., Sugitha, T. C. K., Balachandar, D., & Kumar, K. (2005). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(9), 802–807.
- Singh, G., Sharma, J., & Hoondal, G. (2008). Chitinase Production by *Serratia marcescens* GG5. *Turkish Journal of Biology*, 32, 231–236.
- Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments Induced Systemic Resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One*, 11(6), e0155026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155026>
- Slater H, Crow M, Everson L, Salmond GPC. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Microbiology* 47(2): 303–320.
- Soenens A, Imperial J. 2020. Biocontrol capabilities of the genus *Serratia*. *Phytochemistry Reviews* 19(3): 577–587.
- Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K. 2000. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* Strain B2. *Plant Disease* 84(3): 334–340.
- Someya N, Nakajima M, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K. 2001. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology* 67(4): 312–317.
- Strobel G, Li JY, Sugawara F, Koshino H, Harper J, Hess WM. 1999. Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 145: 3557–3564.
- Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, Watanabe T. 2002. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66(5): 1075–83.
- Suzuki K, Suzuki M, Taiyoji M, Nikaidou N, Watanabe T. 1998. Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62(1): 128–135.
- Swiontek M, Jankiewicz U, Burkowska A, Walczak M. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology* 68(1): 71–81.
- Tan D, Fu L, Han B, Sun X, Zheng P, Zhang J. 2015. Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana Fusarium Wilt. *PLoS One* 10(7): 1–14.
- Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, Cox A, Salmond GPC. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Molecular Microbiology* 36(3): 539–556.
- Ting AY, Meon S, Kadir J, Radu S, Singh G. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *BioControl* 53(3): 541–553.
- Toratani T, Shoji T, Ikehara T, Suzuki K, Watanabe T. 2008. The importance of chitobiase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2170. *Microbiology*, 154(5): 1326–1332.
- Trunk K, Peltier J, Liu YC, Dill BD, Walker L, Gow NAR, Stark MJR, Quinn J, Strahl H, Trost M, Coulthurst SJ. 2018. The type VI secretion system deploys antifungal effectors against microbial competitors. *Nature Microbiology* 3(8): 920–931.
- Tu S, Qiu X, Cao L, Han R, Zhang Y, Liu X. 2010. Expression and characterization of the chitinases from *Serratia marcescens* GEI strain for the control of Varroa destructor, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology* 104(2): 75–82.
- van Lenteren JC, Bale J, Bigler F, Hokkanen HMT, Loomans AJM. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annual Review of Entomology* 51: 609–634.
- van Lenteren Joop C. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. *BioControl* 57(1): 1–20.
- Waliszewski SM, Bermúdez MT, Infanzón RM. 2002. Niveles de DDT en tejido adiposo materno, suero sanguíneo y leche de madres residentes en Veracruz, México. *Estudio 1997-1999. Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 18: 17–25.
- Weise T, Thürmer A, Brady S, Kai M, Daniel R, Gottschalk G, Piechulla B. 2014. VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiology Letters* 352(1): 45–53.
- Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RAA, Goldet G, Slater H, Woodley L, Leeper FJ, Salmond GPC. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology* 56(4): 971–989.
- Zarei M, Aminzadeh S, Zolgharnein H, Safahieh A, Daliri M, Noghahi KA, Ghoroghi A, Motallebi A. 2011. Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(3): 1017–1029.
- Zizumbo D, García P. 2008. El origen de la agricultura, la domesticación de plantas y el establecimiento de corredores biológico-culturales en Mesoamérica. *Revista de Geografía Agrícola* 41: 85–113.



Enzimas del buche de *Melipona beecheii* en el proceso de conversión de néctar a miel

Julietta Grajales-Conesa, Albert Antonio Díaz-Barrios, Víctor Jesús Albores-Flores, José Alfonso López-García*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

Resumen

El buche o saco de miel es reconocido por almacenar el néctar que las abejas colectan de las flores y donde ocurren muchas transformaciones enzimáticas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar las enzimas del buche de *Melipona beecheii* y *Apis mellifera* involucradas en el proceso de conversión de néctar a miel. Adicionalmente se analizaron muestras de cera, néctar y miel. Se capturaron 20 abejas de cada una de las especies de estudio, dividiendo cada una en dos partes para realizar disecciones y obtener el buche, para preparar dos extractos diferentes; Extracto de Buche Sin Néctar (EBSN) y Extracto de Buche Con Néctar (EBCN). Así mismo, a cada muestra se les determinó el contenido de diastasa (D), invertasa (I), glucosa oxidasa (GO), catalasa (CAT), fosfatasa ácida (FA) y proteasa (P) además de parámetros fisicoquímicos como pH, humedad y azúcares reductores. De acuerdo con los resultados, entre muestras y entre especies de abeja, se encontraron diferencias significativas para cada evaluación fisicoquímica. Al comparar los valores enzimáticos, éstos mostraron diferencias significativas, aunque los mayores valores correspondieron a las muestras de EBCN.

Melipona beecheii gut enzymes; from nectar to honey

Abstract

The honey gut is recognized for storing the nectar that bees collect from flowers to subsequently move to the hive. Therefore, the objective of this work was to determine the enzymes of *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* involved in the process of converting nectar to honey. The samples were: wax, nectar and honey. Twenty bees were captured, dividing each one into two parts to dissect and obtain the crop, to prepare two different extracts Bee Gut Extracts Without Nectar (BGEWN) and Bee Gut Extracts Full of Nectar (BGEFN). We determined the diastase content (D), invertase (I), glucose oxidase (GO), catalase (CAT), acid phosphatase (FA) and protease (P) in addition to physicochemical parameters such as pH, moisture and reducing sugars. According to the results, between samples and between bee species, significant differences were found for each physicochemical evaluation. When comparing the enzymatic values, they showed significant differences although the highest values corresponded to the BGEFN samples.

Palabras clave:

β -D-glucopiranosido
Cera
Diastasa
Espectrofotometría
Invertasa

Keywords:

β -D-glucopyranoside
Wax
Diastase
Spectrophotometry
Invertase

* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, CP.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9621104366.
Correo-electrónico:
jose.lopez@unach.mx

1. Introducción

El néctar es la fuente principal de carbohidratos (sacarosa, fructosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa) en la dieta natural de las abejas (Tan et al., 2007). Es succionado o regurgitado por ciertos órganos o estructuras que intervienen en el complejo del sistema digestivo de la abeja como la probóscide (estructuras que se unen para ingerir o regurgitar miel, néctar o agua), bomba de succión el cual es un saco muscular, relativamente grande que empieza en la boca y se ensancha en la parte media, luego reduce de tamaño y se convierte en el esófago, mismo que se conecta a través del cuello membranoso al tórax. El saco de miel es donde se almacena el néctar o miel y el proventrículo donde se añaden enzimas como invertasas y glucosa oxidasas (Crailsheim y Hrassnigg, 2005).

Las invertasas convierten la sacarosa en glucosa y fructosa. Una cantidad pequeña de glucosa es transformada por la glucosa oxidasa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Olaitan et al., 2007). El ácido glucónico hace la miel ácida y el peróxido de hidrógeno tiene propiedades contra bacterias, hongos y levaduras (Mostafa et al., 2014; Zidan, 2009). Otras enzimas que se encuentran relacionadas con el aparato digestivo de las abejas son amilasas, proteasas y lipasas, estas enzimas ayudan a convertir carbohidratos, aminoácidos y lípidos que puedan digerir o absorber las abejas (Wang et al., 2015).

También se ha encontrado la enzima beta-glucosidasa, encargada de la descomposición de diversos oligosacáridos que se encuentran en la biomasa celulósica. Las enzimas de esta clase tienen inusualmente amplias especificidades de sustrato, siendo capaz de unirse a oligosacáridos con diversos tamaños y por lo tanto contribuir significativamente al desgaste del polen (Lee et al., 2015). Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar las enzimas del buche de *M. beecheii* y *A. mellifera* involucradas en el proceso de conversión de néctar a miel.

2. Materiales y métodos

2.1. Sitio de estudio y muestreo

El estudio se realizó en la Finca Agroecológica “Ayol” (14°49'45"N, 92°17'47"W) ubicada en Tapachula, Chiapas, México. En este sitio se encuentran las especies que se utilizaron en este trabajo; *A. mellifera* y *M. beecheii*, rodeada de especies vegetales como frutales de banano (*Musa* spp.), plátano macho (*Musa balbisiana*), piña (*Ananas comosus*), papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*), rambután (*Nephelium lappaceum*) y otras especies vegetales.

Se realizaron tres muestreos correspondientes a los meses de agosto, octubre de 2017 y enero de 2018, que coinciden con las temporadas de lluvias, fin de lluvias y seca, respectivamente. Las muestras recolectadas, para ambas especies, fueron cera, néctar, miel y abejas de acuerdo con los métodos de muestreo establecidos por la AOAC (1996), directamente de la colmena y se envasaron en frascos de plástico y de vidrio estériles. Posteriormente, se trasladaron

a los laboratorios del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas (IBC-UNACH) para su almacenamiento en cuarto frío a una temperatura de 8 °C.

Además, se capturaron 20 abejas de cada especie por cada muestreo para realizar su respectiva disección y extracción del buche para elaborar el extracto acuoso. Se dividieron en dos grupos: 10 abejas para su rápida disección, obteniendo así el Extracto de Buche Con Néctar (EBCN) y las otras 10 abejas se mantuvieron con vida por 24 horas para que consumieran el néctar que se encontraba en el buche y así realizar su respectiva disección-extracción para realizar el Extracto de Buche Sin Néctar (EBSN). Previamente a la disección, las abejas se sumergieron en 20 mL de etanol al 75% durante 1 min para esterilizar su superficie y se enjuagaron 3 veces en agua destilada. Se diseccionaron con bisturí estéril, el buche se colocó en un vaso de precipitado conteniendo 50 mL de solución salina fisiológica estéril (40 mL de NaCl, 5 mL de Tween 80 y 5 mL de agua destilada) y se almacenó a -20 °C. Después se agitaron por 90 s y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min, se recuperó el sobrenadante para el análisis enzimático.

2.2 Propiedades fisicoquímicas y actividad enzimática de las muestras

Se determinó el pH y la humedad de las muestras utilizando un potenciómetro y refractómetro, respectivamente, de acuerdo con los métodos establecidos por el CODEX-STAN 12-1981 (Codex, 1987). Además, se realizó la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría empleando el reactivo 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando el método descrito por Saxena et al. (2010). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La actividad diastásica se evaluó por el método de Zandamela-Mungó (2008), la actividad invertasa y glucosa oxidasa fueron cuantificados por el método de Bachmann (2007). Se determinó la actividad catalasa empleando la técnica de García et al. (1994). La actividad fosfatasa ácida y proteasa se determinaron siguiendo el método de Toro-Zúñiga (2004). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3 Análisis de datos

Todos los resultados obtenidos se sometieron a análisis de la varianza y posterior contraste de medias utilizando la prueba de Hotelling ($p < 0.05$). Para determinar la formación de grupos, se utilizó el Análisis Discriminante y para determinar las variables influyentes se realizó un Análisis de Componentes Principales. Se empleó el programa estadístico Infostat 2015®.

3. Resultados

Los valores de cada evaluación fisicoquímica realizada al buche de abejas de cada especie, miel, néctar y cera se presentan en el Cuadro 1. Se encontró entre muestras y entre especies de abeja, diferencias en los valores obtenidos de cada evaluación fisicoquímica realizada. La comparación de

Cuadro 1. Medias \pm DE de las propiedades fisicoquímicas y de las enzimas de las muestras colectadas. Mb; *Melipona beecheii*, Am; *Apis mellifera*, EBCN; extracto de buche con néctar, EBSN; Extracto de buche sin néctar.

| Especie | Muestra | Diastasa | Invertasa | Glucosa oxidasa (meq de GO kg ⁻¹) | Catalasa (mmoles de H ₂ O ₂) consumidos g ⁻¹ h ⁻¹ | Fosfatasa | Proteasa | pH | Humedad (g 100 g ⁻¹) | Ázucares reductores (g 100 g ⁻¹) | |
|---------|---------|------------------|--------------------|---|--|------------------|------------------|------------------|----------------------------------|--|----|
| Mb | EBCN | 14.66 \pm 1.76 | 42.32 \pm 2.3 | 16.11 \pm 5.46 | 0.68 \pm 0.46 | 7.94 \pm 0.39 | 8.6 \pm 0.13 | 6.89 \pm 0.11 | 76.27 \pm 2.96 | 0.54 \pm 0.02 | A |
| Mb | EBSN | 11.67 \pm 0.75 | 16.56 \pm 0.16 | 8.89 \pm 3.33 | 0.51 \pm 0.25 | 5.91 \pm 0.19 | 5.55 \pm 0.1 | 7.09 \pm 0.14 | 91.01 \pm 1.61 | 0.25 \pm 0.01 | B |
| Mb | MIEL | 13.13 \pm 0.8 | 111.05 \pm 2.34 | 76.67 \pm 26.34 | 0.36 \pm 0.19 | 9.62 \pm 0.07 | 24.46 \pm 0.12 | 3.54 \pm 0.15 | 27.26 \pm 2.07 | 72.38 \pm 0.6 | C |
| Mb | NÉCTAR | 8.61 \pm 0.68 | 16.19 \pm 4.79 | 46.11 \pm 19.97 | 0.58 \pm 0.96 | 3.74 \pm 0.16 | 14.07 \pm 0.06 | 3.45 \pm 0.16 | 62.51 \pm 3.44 | 39.25 \pm 0.14 | D |
| Am | NÉCTAR | 11.6 \pm 3.52 | 412.36 \pm 79.57 | 46.11 \pm 10.54 | 0.57 \pm 0.96 | 2.19 \pm 0.24 | 15.72 \pm 2.45 | 3.6 \pm 0.12 | 46.06 \pm 2.86 | 35.36 \pm 1.89 | E |
| Am | EBCN | 15.34 \pm 1.96 | 32.66 \pm 1.99 | 28.67 \pm 55 | 1.12 \pm 0.25 | 10.64 \pm 0.44 | 11.21 \pm 1.51 | 6.00 \pm 1.38 | 77.25 \pm 4.58 | 0.48 \pm 3.20E-03 | F |
| Am | EBSN | 13.58 \pm 3.17 | 22.05 \pm 3.07 | 13.89 \pm 13.87 | 0.28 \pm 0.12 | 4.86 \pm 0.42 | 6.13 \pm 1.24 | 6.25 \pm 1.09 | 89.32 \pm 3.26 | 0.16 \pm 0.01 | G |
| Am | MIEL | 19.64 \pm 6.38 | 245.77 \pm 37.92 | 70.56 \pm 23.38 | 0.3 \pm 0.16 | 11.77 \pm 0.59 | 19.5 \pm 3.05 | 4.29 \pm 1.18 | 26.54 \pm 3.02 | 61.01 \pm 0.77 | H |
| Am | CERA | 4.24 \pm 1.49 | 4.54 \pm 1.29 | 20.56 \pm 8.08 | 0.02 \pm 9.4E-04 | 0.53 \pm 0.07 | 1.15 \pm 0.34 | 7.21 \pm 0.129 | 2.73 \pm 0.45 | 0.23 \pm 0.01 | I* |
| Mb | CERA | 6.51 \pm 1.55 | 3.77 \pm 0.08 | 17.78 \pm 5.07 | 0.03 \pm 2.00E-03 | 0.87 \pm 0.02 | 1.00 \pm 0.11 | 7.07 \pm 0.04 | 2.73 \pm 0.45 | 0.32 \pm 0.01 | I |

medias multivariada (prueba de Hotelling, $p < 0.05$) define a las muestras de cera de ambas especies de abeja como similares y diferenciándose de los valores obtenidos en miel, néctar y extracto de buche con y sin néctar, por contener los valores menores en la mayoría de las evaluaciones fisicoquímicas.

Las mieles de ambas especies de abeja únicamente son similares en la prueba de glucosa oxidasa, con los valores más altos en esta evaluación comparada con las demás muestras. En las determinaciones fisicoquímicas de diastasa y fosfatasa ácida, la miel de *A. mellifera* presentó valores altos en las pruebas de proteasa y azúcares reductores, comparado con las demás muestras.

En las muestras de néctar, entre las especies de abeja, se obtuvieron resultados similares en las evaluaciones de glucosa oxidasa, catalasa, fosfatasa ácida, proteasa y azúcares reductores; a diferencia de la prueba de invertasa, donde se encontró que el valor más alto correspondió a la especie de *A. mellifera*. La diferencia entre estas muestras se observó en valores de diastasa, pH y humedad.

En las muestras de extracto de buche, al comparar EBSN y EBCN, se observa que los valores de las propiedades

fisicoquímicas evaluadas en la mayoría de estas variables son menores en EBSN y mayores en EBCN, en ambas especies de abeja. En el EBSN de *M. beecheii*, se presentaron valores neutros de pH y el más alto valor de humedad. En el extracto de buche con néctar de *A. mellifera* se presentó el valor más alto de catalasa y fosfatasa ácida.

En general, las muestras de cera y de extracto de buche (sin y con néctar) presentaron los valores menores en las variables glucosa oxidasa y azúcares reductores, caso contrario en valores de pH.

El análisis discriminante de las variables estudiadas explica el 95.95 % de la varianza. Las variables azúcares reductores, proteasa e invertasa, que corresponde al 88.63 % de la varianza, son las de mayor peso. El porcentaje restante, 7.32 %, corresponde a las variables fosfatasa ácida y humedad. El resto de la varianza, 4.03 %, corresponde a las variables restantes en la clasificación de las muestras estudiadas. Lo anterior, permite observar la diferencia entre muestras de cera y de extracto de buche (sin y con néctar), para ambas especies de abeja de las muestras de miel y néctar (Figura 1).

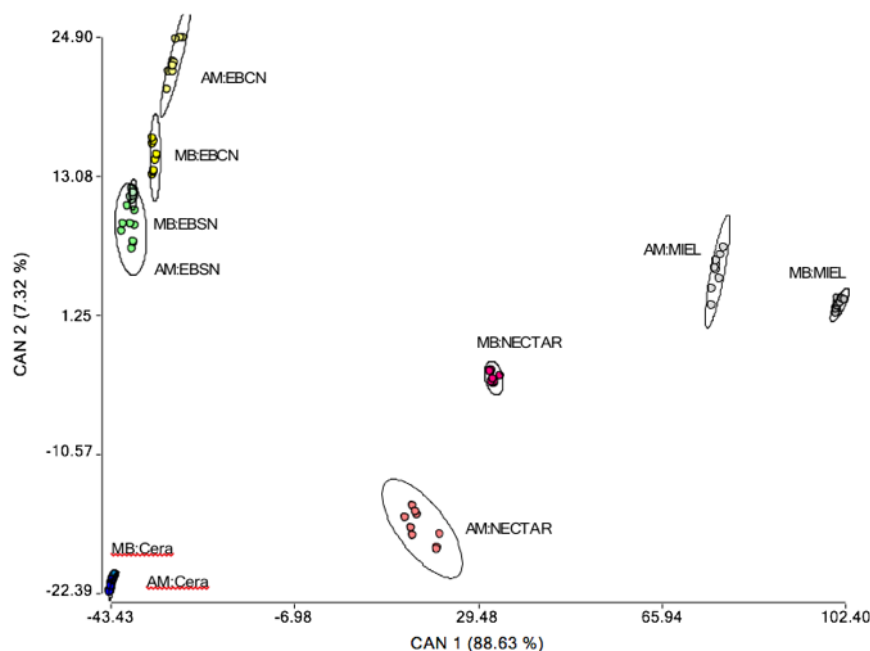


Figura 1. Análisis discriminante canónico de las muestras de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii*.

En el análisis de componentes principales, entre las especies y las muestras, los primeros dos componentes explican el 81.0 % de la varianza mostrando que la actividad de invertasa, glucosa oxidasa, proteasa, contenido de azúcares reductores están fuertemente presentes en las muestras de miel y néctar de ambas especies (Figura 2). La actividad de diastasa, catalasa, fosfatasa ácida y humedad tienen relación con las muestras de extracto de buche con néctar mientras que las muestras restantes se relacionan con el pH; a excepción de las

muestras de cera que no tienen relación con ninguna variable estudiada. En el CP1, la mayoría de las variables presentan un valor de coeficiente positivo (en el eje X), a diferencia de la variable pH que es negativo (Figura 2). Debido a lo anterior, mientras el pH tiende hacia la acidez menor actividad enzimática y azúcares reductores estarán presentes en las muestras.

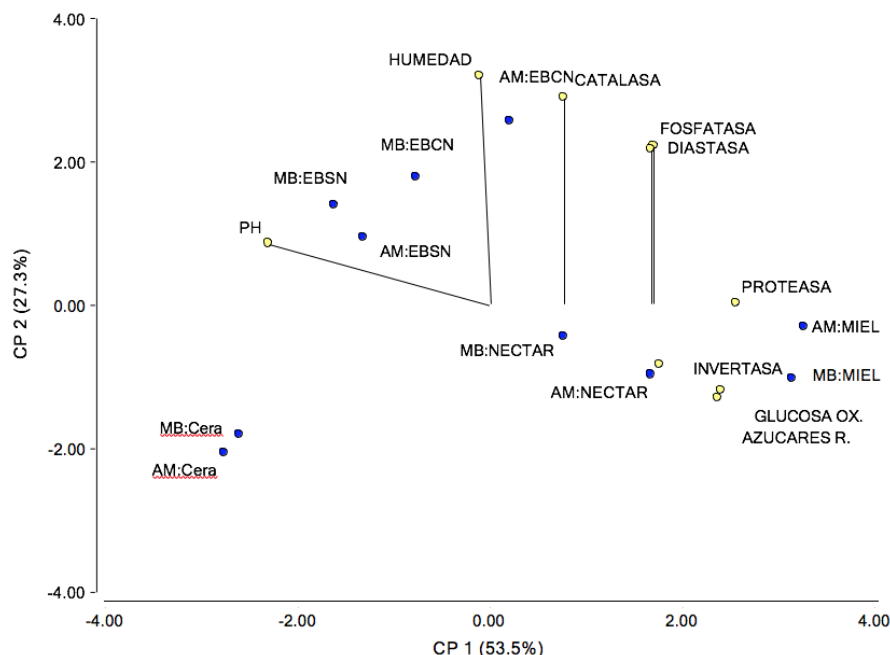


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de las muestras de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii*.

4. Discusión

La actividad diastásica que es un indicio de la actividad de enzimas amilolíticas fue entre las especies, en las muestras de néctar, miel, EBCN y EBSN iguales entre sí y diferentes significativamente con respecto a las muestras de cera. Siendo estas últimas muestras las que obtuvieron la menor concentración del resto de muestras. Esto es consistente con lo esperado, pues al tratarse de una enzima de origen vegetal no se encuentra en alta proporción en este producto elaborado netamente por las abejas. En cuanto a las muestras de miel, las muestras provenientes de la especie *A. mellifera* tuvieron mayor concentración que las de *M. beecheii* (19.64 ID y 13.13 ID, respectivamente). Las muestras de néctar no fueron significativamente diferentes, sin embargo, el índice de diastasa fue mayor en las muestras de *A. mellifera* con una diferencia de 2.99 ID que las de *M. beecheii* (Wang et al., 2015). La actividad diastásica en las muestras de EBSN fue ligeramente superior en la especie *A. mellifera* al igual que en las muestras de EBCN. Lo anterior puede ser un indicio de que la enzima diastasa se estaría añadiendo desde el buche o saco de miel más que del néctar floral, contrario con lo reportado por Bogdanov (2008), Persano-Oddo et al. (2008) y Wang et al. (2015) o bien que las enzimas se han traslocado de modo eficiente del néctar hacia el buche y la miel.

La enzima invertasa, responsable de la hidrólisis de sacarosa, carbohidrato predominante en la miel (Parvanov et al., 2012; Cauich Kumul et al., 2015), estuvo presente en mayor concentración en las muestras de néctar de *A. mellifera*, caso contrario a las de *M. beecheii*. Las muestras de miel de *A.*

mellifera tuvieron concentraciones mayores comparadas con las de *M. beecheii*, similares con lo que reporta Moguel et al. (2005), Bachmann (2007) y Karabournioti y Zervalaki (2010). Las concentraciones menores obtenidas correspondieron a las muestras de cera y en particular a las de *M. beecheii*. En cuanto a las muestras de EBCN, la concentración más alta fue en *M. beecheii* y en las muestras de EBSN fueron las de *A. mellifera*, demostrando que el mayor aporte enzimático no proviene del buche de la abeja sino de la flora o de secreciones de las glándulas salivales o hipofaríngeas de las abejas tal como lo reporta Al-Sherif et al. (2017).

Además de la invertasa, las abejas también adicionan glucosa oxidasa, que oxida la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, provocando que la miel sea más ácida y transmitiendo a la miel actividad antimicrobiana (Ohashi y Kubo, 1999, Al-Sherif et al., 2017). Se obtuvo, en las muestras de néctar para ambas especies la misma concentración de actividad enzimática. Mientras que, en las muestras de miel se observó una concentración mayor en las de *M. beecheii* que en las de *A. mellifera* con 6.11 meq de GO kg⁻¹ de diferencia con valores relativamente similares a los reportados por Acquarone (2004), Bachmann (2007) y Strelec et al (2018). Para esta enzima, las muestras de cera tuvieron concentraciones mayores a las anteriores enzimas, con 20.56 meq de GO kg⁻¹ en *A. mellifera* y 17.78 meq de GO kg⁻¹ en *M. beecheii*. Mientras que, para los valores de los extractos, las muestras de *A. mellifera* tuvieron aproximadamente el doble de concentración que las de *M.*

beecheii (Takenaka et al., 1990); y en ésta última, el EBCN tuvo la concentración mayor con 16.11 meq de GO kg⁻¹.

El peróxido de hidrógeno, producto de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa, es catalizado por la enzima catalasa, descomponiéndola en oxígeno y agua. En las muestras de cera, esta enzima obtuvo las concentraciones más bajas para ambas especies oscilando entre 0.02-0.03 mmoles de H₂O₂ consumidos g⁻¹ h⁻¹. En cuanto al néctar, las muestras tuvieron concentraciones similares con una diferencia entre ambas del 0.01 mM de H₂O₂ consumidos g⁻¹ h⁻¹, siendo las segundas concentraciones más altas del resto de muestras demostrando que el néctar floral posee una cantidad considerable de enzimas y que a su vez es recolectado por la abeja introduciéndolo al buche y este a su vez añade cierta cantidad, mostrando mayores concentraciones, específicamente, en el EBCN de *A. mellifera* y *M. beecheii* con 1.12 y 0.68 H₂O₂ consumidos g⁻¹ h⁻¹; resultados relativamente similares con lo reportado por Álvarez-Pérez et al. (2012).

La fosfatasa ácida (FA), tiene la función principal en miel de remover fosfatos inorgánicos de fosfatos orgánicos además de ser una enzima que está relacionada con la fermentación de la miel (Alonso-Torre et al., 2006), mientras que la enzima proteasa (P) actúa rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas para liberar los aminoácidos y así ser más asimilables al organismo además de funciones de transporte de proteínas, estructura celular y tisular, coagulación de sangre e inmunológico y degradación-activación de proteínas o enzimas (Avilés et al., 1994; Lima et al., 2000). Las concentraciones más bajas para ambas enzimas fueron en las muestras de cera, particularmente la FA en las muestras de *M. beecheii*. Las muestras de néctar tuvieron concentraciones de 3.74 y 2.19 mg mL⁻¹ de FA en *M. beecheii* y *A. mellifera* demostrándose cantidades variables dependientes de la especie floral tal como lo reporta Nicholson y Thornburg (2007). Las concentraciones de proteasa fueron las segundas más altas de las demás con 14.07 y 15.72 mg mL⁻¹ en *M. beecheii* y *A. mellifera*. Las muestras de miel de *A. mellifera* obtuvieron altas concentraciones con un promedio de 11.77 mg mL⁻¹ de FA, caso contrario a las de *M. beecheii* que fueron de 9.62 mg mL⁻¹ de FA demostrando que en las muestras de miel de *A. mellifera* existe mayor presencia de FA y que esta a su vez está directamente relacionada con el deterioro y fermentación de la miel tal como lo demuestra Alonso-Torre et al. (2006) indicando que a mayor tiempo de almacenamiento o fermentación menor será la concentración de FA en la miel. Los valores de proteasa en miel fueron más altos en las muestras de *M. beecheii* con un promedio de 24.46 mg mL⁻¹ de P contra 19.5 mg mL⁻¹ de P en muestras de *A. mellifera*. Para ambas enzimas, las muestras de EBCN de ambas especies mostraron mayores concentraciones que las muestras de EBSN y en específico, las muestras de EBCN oscilaron en un promedio de 8.6 mg mL⁻¹ en *M. beecheii* y *A. mellifera* con 11.21 mg mL⁻¹ para proteasa y para fosfatasa ácida en muestras de *M. beecheii* con 7.94 mg mL⁻¹ y *A. mellifera* con 10.64 mg mL⁻¹, valores nada cercanos a los

reportados por Zakaria (2007) quien reporta que la hemolinfa y membrana peritrófica son otros órganos que adicionan este tipo de enzimas.

En cuanto a las propiedades físicoquímicas, el pH de las muestras de cera osciló en la neutralidad con 7.21 para las muestras de *A. mellifera* y 7.07 para las de *M. beecheii*. Las muestras de néctar de *M. beecheii* tendieron más a la acidez con un pH de 3.45 caso contrario a las muestras de *A. mellifera* con un pH de 3.6, esto dependiendo en mayor parte por la especie floral donde fue recolectada por las abejas, además de que los resultados son totalmente diferentes a lo reportado por Nicolson y Thornburg (2007), quienes mencionan que el néctar recién colectado tendría un pH ligeramente ácido con un promedio alrededor de 6.5. Concordando con los resultados de Nicolson y Thornburg (2007), las muestras de miel de *M. beecheii* tendieron hacia la acidez con un pH de 3.54 opuesto a las muestras de *A. mellifera* con un pH de 4.29. El pH de las muestras de EBCN y EBSN tendieron hacia la neutralidad y, aunque el pH óptimo de la diastasa es de 5.3 a 5.6 (Babacan y Rand, 2007), ninguna de las muestras entra dentro de ese rango; sin embargo, las muestras de EBCN tuvieron mayor concentración al igual que las muestras de miel. Para el caso de la enzima invertasa, ninguna de las muestras estuvo dentro del pH óptimo promedio de 4.5 (Kulshrestha et al., 2013), no obstante, las muestras de EBCN tuvieron las terceras concentraciones más altas del resto. Lo mismo para la enzima glucosa oxidasa, pH óptimo de 4.5 a 5.0 (Takewaki et al., 2014). Los valores más altos en actividad enzimática para catalasa se presentaron en las muestras de EBCN de ambas especies aun cuando el pH óptimo de dicha enzima esta entre 4.8-5.5 (Kim et al., 2014), no concordando con lo obtenido. Al ser una enzima que muestra baja actividad enzimática y menos resistencia al tratamiento térmico y almacenamiento que diastasa, invertasa y glucosa oxidasa; la enzima fosfatasa ácida tiene un pH óptimo de 4.5-6.5 (Alonso-Torre et al., 2006) y en los resultados obtenidos, el pH de los EBCN y EBSN estuvieron dentro de los rangos óptimos y las concentraciones obtenidas fueron las segundas más altas que las demás.

Para las muestras estudiadas, los extractos obtuvieron el mayor porcentaje de humedad, cuando las muestras de néctar fueron las que obtuvieron el segundo lugar, indicando que la mayor cantidad de humedad es provista por el néctar condicionando la velocidad de eliminación del agua a una serie de factores tales como las condiciones de tiempo y del flujo del néctar, la cantidad y concentración de néctar transportada con una determinada unidad de tiempo, la temperatura y humedad del ambiente. Cuando la humedad del exterior es mayor que la interior, la acción se invierte y la miel absorbe humedad debido a las propiedades higroscópicas de los carbohidratos presentes en la miel (Ball, 2007; Rios-Corripio, 2012). Dichos carbohidratos constituyen el 95-99% de la materia seca de la miel y en consecuencia son responsables en mayor parte de las cualidades de la miel como viscosidad, propiedades térmicas,

higroscopicidad, etc. En las muestras analizadas, la mayor presencia de azúcares reductores fue en la miel y en el néctar por lo que se demuestra que muchos de los azúcares de la miel no se encuentran en el néctar, sino que se forman durante la maduración y almacenamiento por acción de las enzimas (Bachmann, 2007).

5. Conclusión

Las muestras de cera y de los extractos tuvieron pH neutros, mientras que las muestras de néctar y miel presentaron valores de pH bajos. Además, ninguna de las anteriores muestras está dentro de los límites permisibles de las normas oficiales. Las enzimas que mayor concentración tuvieron para los extractos de buche con y sin néctar fueron la diastasa, catalasa y fosfatasa ácida mientras que las muestras de néctar y miel tuvieron concentraciones altas en invertasa, glucosa oxidasa y proteasa.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

- Acquarone CA. 2004. Physicochemical parameters of honeys, relationship between them and their potential application for the determination of the botanical and / or geographical origin of Argentine honeys. Thesis. Belgrano University.
- Al-Sherif A, Mazeed A, Ewis M, Nafea E, Hagag E, Kamel A. 2017. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*A. mellifera* L.). *Physiological Entomology* 42(4): 397-403.
- Alonso-Torre S, Cavia M, Fernández-Muiño M, Moreno G, Huidobro J, Sancho M. 2006. Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry* 97(4): 750-755.
- Álvarez-Pérez S, Herrera C, De Vega C. 2012. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 80(3): 591-602.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 1996. Official methods of analysis. Ed. Arlington. USA. 2209 p.
- Babacan S, Rand, AG. 2007. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Science* 72(1): C050-C055.
- Bachmann H. 2007. Preliminary studies of honey honey characterization: determination of carbohydrates by GC / MS and enzymatic analysis. Thesis. Southern University of Chile.
- Ball DW. 2007. The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education* 84(10): 1643.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallman P. 2008. Honey for nutrition and health. *American Journal of the College of Nutrition* 27: 677-689.
- Cauich-Kumul R, Ruíz-Ruíz J, Ortíz-Vázquez E, Segura-Campos R. 2015. Antioxidant potential of honey from *Melipona beecheii* and its relationship with health: a review. *Hospital Nutrition* 32(4): 1432-1442.
- Codex. 1987. STAN 12-1981. Codex standard for honey. Codex Alimentarius. FAO/WHO.
- Crailsheim K, Hrassnigg N. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36(2): 255-277.
- Delage DB y Darchen R. (1982). Digestive enzymes of the salivary glands and the midgut of a social Mexican bee *Melipona beecheii*. *Annales- des Sciences – Naturelles – Zoologie*, 4(2): 91-96.
- García C, Hernández T, Costa F. 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology Biochemistry*. 26: 1185-1191.
- Karabournioti S, Zervalaki P. 2010. Effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta* 26(4): 177-181.
- Kim PS, Shin NR, Kim JY, Yun JH, Hyun DW, Bae JW. 2014. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Microbiology* 52(8): 639-645.
- Kulshrestha S, Tyagi P, Sindhi V, Yadavilli KS. 2013. Invertase and its applications – A brief review. *Journal of Pharmacy Research* 7(9): 792-797.
- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton IL. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology* 17(3): 796-815.
- Lima P, Brochetto-Braga R, Chaud-Netto J. 2000. Proteolytic activity Africanized honeybee (*A. mellifera*: Hymenoptera, Apidae) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 6(1): 64-76.
- Moguel Y, Echazarreta-González C, Mora-Escobedo R. 2005. Physicochemical quality of honey from honeybees *Apis mellifera* produced in the State of Yucatan during different stages of the production process and blossoms. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 43(3): 323-334.
- Mostafa S, Naby A, Wafeek-Zidan E. 2014. Activity level of lactate dehydrogenase and β -glucosidase enzymes in the honeybee colonies, (*Apis mellifera* L.) with different feeding. *Journal of Agricultural Technology* 10(2): 483-491.
- Nicolson SW, Thornburg RW. 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. (eds) *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- Official Mexican Standard. NOM-145-SCFI-2001. Commercial information- labeling of honey in its different presentations.
- Ohashi K, Kubo T. 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*A. mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* 265: 127-133.
- Olaitan PB, Olufemi E, Ola I. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and a inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7(3): 159-165.
- Parvanov X, Dinkov D, Tananaki C. 2012. Invertase activity and carbohydrate spectrum of organic acacia and polyfloral honey After one-year storage. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 15(3): 198-205.
- Persano-Oddo L, Heard T, Rodríguez-Malaver A, Pérez A, Fernández-Muiño M, Sancho M, Sesta G, Lusco L, Vit P. 2008. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *Journal of Medicinal food*. 11 (4): 789-794.

- Rios-Corripio A. 2012. Bee honey chemometrics for the detection of sugars and detection of adulteration using infrared spectroscopy. Thesis. Universidad Politécnica Nacional.
- Saxena S, Gautam S, Sharma A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry* 118(2): 391-397.
- Strelec I, Crevar B, Kovac T, Bilic B, Primorac L, Flanjak I. 2018. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10(1): 33-41.
- Takewaki S, Chiba S, Kimura A, Matsui H, Koike Y. 2014. Purification and properties of α -glucosidases of the honey bee *Apis mellifera* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 44(4): 731-740.
- Tan K, Guo, Y, Nicolson S, Radloff S, Song Q, Hepburn H. 2007. Honey bee (*Apis cerana*) foraging responses to the toxic honey of *Tripterygium hypoglaucum* (Celastraceae): changing threshold of nectar acceptability. *Journal of Chemical Ecology* 33: 2209-2217.
- Takenaka T, Ito H, Yatsunami K, Echigo T. 1990. Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during the lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 54(8): 2133-2134.
- Toro-Zúñiga VC. 2004. Biochemical profile of rhizospheric fungal strains. Thesis. Southern University of Chile.
- Wang M, Zhao W, Xu H, Wang Z, He Sh. 2015. *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *European Journal of Entomology*. 112(4): 619-624.
- Zakaria ME. 2007. Factors affecting on the food metabolism in some honey bee races. *Journal of Applied Science Research* 3(4): 311-316.
- Zandamela-Mungó EM. 2008. Physical-chemical characterization and sanitary evaluation of Mozambique honey. Thesis. Autonomous University of Barcelona.
- Zidan EW. 2009. Studies on varroa mite and its effect on productivity of honeybee colonies. ph. D. Thesis, Bahna University, Egypt.