



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**RESPUESTA DE LEVADURAS PROVENIENTES DE
NÉCTAR FLORAL Y MIEL DE *MELIPONA BEECHEII* ANTE
UN GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA**

Tesis que presenta

CÉSAR HUMBERTO CANCHÉ COLLÍ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Recursos Naturales

Mérida, Yucatán, México.

Diciembre de 2012





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Respuesta de levaduras provenientes de néctar floral y miel de *Melipona beecheii* ante un gradiente de concentración de glucosa” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Azucena Canto Aguilar, dentro de la Opción Recursos Naturales, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.



Mérida, Yucatán, México; a 05 de diciembre de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Nombre: César Humberto Canché Collí

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado con mucho cariño y amor a Violeta y a mi familia (Cristina, Carolina, Laura y Gerardo) quienes motivan mi esfuerzo máximo

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. En especial, a la Unidad de Recursos Naturales por facilitarme material, equipo y laboratorios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No. 242994 para realizar la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al proyecto CONACyT “La importancia de las levaduras en la interacción entre plantas melíferas y abejas nativas productoras de miel en el estado de Yucatán” con clave de registro 80031.

A la Dra. Azucena Canto Aguilar con mucho cariño y afecto por la dirección de esta tesis y por todas las valiosas enseñanzas brindadas en el terreno profesional y personal en mi estancia en el CICY.

A los integrantes de mi comité de evaluación: Dra. Azucena Canto Aguilar, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Carlos Herrera, Dr. Felipe Barahona y Dr. Luis Medina, por todos sus comentarios y sugerencias que enriquecieron esta tesis y mi aprendizaje.

Al Dr. Felipe Barahona por facilitarme el acceso a sus laboratorios y por sus consejos y sugerencias que enriquecieron mi formación.

A la Dra. Cecilia Rodríguez y al Dr. José Luis Andrade por cada una de sus enseñanzas en el área de la redacción y la divulgación científica.

Al técnico de investigación Rosalina Rodríguez Román por todos sus comentarios, sugerencias y apoyo en el laboratorio que en general contribuyeron al buen término de este trabajo.

A los técnicos de la Unidad de Energía Renovable Jorge Domínguez y Tanit Toledano por todas las facilidades, enseñanzas y apoyo brindado en el laboratorio.

A los técnicos de la Unidad de Biotecnología Mirbella Cáceres, Leticia Medina y Karlina García por todas las facilidades y el apoyo en el trabajo de laboratorio.

A Violeta Acosta Arriola por todo su apoyo incondicional, cariño y comprensión en todos los momentos que hemos compartido juntos.

A mi equipo de alma: "La Selección Natural", integrado por Alfredo Dorantes, Alberto Cortés, Paul Hoesktra, Anuar Magaña, Ignacio Hernández, Rubén Andueza, Gabriel Dzib, Gerardo Godoy, Joel Ortega y Javier Mijangos, por todas las tardes de buen fútbol y campeonatos obtenidos.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Recursos Naturales Alfredo, Wendy, Gerardo, Raymundo, Blanquita, Edilia, Leonardo, Agatha, Nahleli, Carmen, Omar, Lizandro, Arturo, Gabriel, René, Mariela, Rubén, Eduardo, Yaneth, Carlos, Sara, Rodrigo (rorro), Rodrigo (chelito), Lupita, Cach, Erika, Paul, Francisco, Rosalina, Verónica, Alfredo (Alf), Irving y María por compartir conmigo momentos muy agradables en mi estancia en el CICY, siempre estarán presentes.

ÍNDICE	Pág.
Índice de figuras.....	iii
Índice de cuadros.....	vi
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I.....	3
Introducción.....	3
Antecedentes generales.....	6
El néctar floral.....	6
La miel.....	7
Características generales de las levaduras.....	8
Levaduras asociadas al néctar floral.....	9
Microorganismos vinculados a la miel: énfasis en levaduras.....	11
Levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares.....	12
Crecimiento microbiano: características y formas de estimación.....	14
Sistema de estudio.....	15
Justificación.....	17
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Estrategia experimental.....	19
Referencias bibliográficas.....	19
Capítulo II	
Calibración de curvas de crecimiento por absorbancia y conteos celulares en tres especies de levaduras aisladas en néctar floral y miel de <i>Melipona beecheii</i>	29
Introducción.....	29
Materiales y Métodos.....	30
Reactivación de cepas.....	30
Curvas de calibración.....	31
Análisis estadísticos.....	31

Resultados.....	32
Discusión.....	40
Recomendaciones.....	42
Referencias bibliográficas.....	43

Capítulo III

Curvas de crecimiento y morfología celular de levaduras del néctar de plantas melíferas y de la miel de *Melipona beecheii*, ante un gradiente de concentración de glucosa.....

de glucosa.....	45
Introducción.....	45
Materiales y Métodos.....	46
Selección de especies de estudio.....	46
Morfología macroscópica de levaduras.....	47
Curvas de crecimiento y morfología celular de levaduras.....	48
Análisis estadísticos.....	49
Resultados.....	50
Morfología de las colonias.....	50
Curvas de crecimiento:.....	51
Morfología celular de levaduras.....	59
Discusión.....	64
Referencias bibliográficas.....	72

Capítulo IV

Discusión general, conclusiones y perspectivas

Discusión General.....	77
Conclusiones.....	79
Perspectivas.....	80
Referencias bibliográficas.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Figura 1.	Esquema simplificado de la estrategia experimental.....	19
Figura 2.	Regresión cuadrática con constante de valor cero entre el número de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> registradas por conteo celular y el estimado por el método óptico de absorbancia durante el crecimiento.....	33
Figura 3.	Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.....	34
Figura 4.	Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de <i>Metschnikowia koreensis</i> registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.....	35
Figura 5.	Crecimiento de <i>Metschnikowia koreensis</i> expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.....	36
Figura 6.	Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de <i>Sympodiomyopsis paphiopedili</i> registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.....	37
Figura 7.	Crecimiento de <i>Sympodiomyopsis paphiopedili</i> expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.....	38
Figura 8.	Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de <i>Candida cf. apicola</i> registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.....	39
Figura 9.	Crecimiento de <i>Candida cf. apicola</i> expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.....	40
Figura 10.	Características de colonias en cultivo GELPA de a) <i>Metschnikowia koreensis</i> , b) <i>Sympodiomyopsis paphiopedili</i> , c) <i>Candida cf. apicola</i> y d) <i>Candida apicola</i> . Estas levaduras se aislaron en el néctar de plantas melíferas y en la miel de <i>M. beecheii</i>	51
Figura 11.	Cinética de crecimiento de <i>Metschnikowia koreensis</i> en medio GELP	

	con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E del número de células.....	52
Figura 12.	Cinética de crecimiento de <i>Sympodiomyces paphiopedili</i> en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E del número de células.....	54
Figura 13.	Cinética de crecimiento de <i>Candida apicola</i> en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.....	56
Figura 14.	Cinética de crecimiento de <i>Candida cf. apicola</i> en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.....	57
Figura 15.	Células de <i>Metschnikowia koreensis</i> cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.....	60
Figura 16	Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de <i>Metschnikowia koreensis</i> . En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.....	60
Figura 17.	Células de <i>Sympodiomyces paphiopedili</i> cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X:.....	61
Figura 18.	Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de <i>Sympodiomyces paphiopedili</i> . En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.....	61
Figura 19.	Células de <i>Candida apicola</i> cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.....	62

Figura 20	Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de <i>Candida apicola</i> . En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.....	62
Figura 21	Células de <i>Candida cf. apicola</i> cultivadas en GELP con a) 2 % b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.....	63
Figura 22	Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de <i>Candida cf. apicola</i> . En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Pág.

- Cuadro 1.** Relación de las levaduras en este estudio y los sitios de su aislamiento. Se incluyen además, datos sobre su identificación por secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal 26S del ADN y la posterior consulta en el GenBank con el programa BLAST... **47**
- Cuadro 2.** Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}), tiempo de duplicación (t_d) y duración de la fase exponencial (t) en horas, de levaduras aisladas de néctar floral y de miel, ante un gradiente de concentración de glucosa..... **53**

RESUMEN

Las levaduras nectarívoras son microorganismos asociados al néctar de las plantas. Se les ha encontrado asociadas también al ciclo de vida de las abejas, a los aprovisionamientos de alimento y a la miel dentro de los nidos. No se cuenta con suficiente información sobre el papel que desempeñan en la transformación del néctar floral a miel. Para esto, se requiere primeramente, conocer la respuesta de las levaduras a incrementos progresivos en la concentración de azúcares en el medio de crecimiento, porque durante la conversión de néctar a miel, tal incremento ocurre por acción de las abejas y provoca un aumento gradual de la presión osmótica entre la célula y el medio exterior, bajo el cual sólo persisten organismos osmotolerantes. Es por ello, que la presente tesis se enfocó en estudiar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre el crecimiento de levaduras del néctar floral (*Metschnikowia koreensis* y *Symphodiomyces paphiopedili*) y de la miel de *Melipona beecheii* (*Candida apicola* y *Candida cf. apicola*). Para estimar el crecimiento en cada cepa, se generaron curvas de calibración utilizando datos espectrofotométricos de absorbancia y conteos celulares. A partir de cultivos líquidos, se evaluó el efecto de las concentraciones de 2 %, 10 %, 20 %, 40 % y 60 % de glucosa sobre el crecimiento y la morfología de células. Las curvas de calibración utilizadas produjeron predicciones adecuadas del crecimiento celular de las levaduras estudiadas. Aunque todas las cepas presentaron crecimiento en las distintas concentraciones de glucosa establecidas, el incremento en la concentración del medio redujo significativamente el crecimiento. En general, las cepas de *C. apicola*, *C. cf. apicola* y *M. koreensis* tuvieron un rápido crecimiento ante las diferentes concentraciones de glucosa, pero de manera opuesta *S. paphiopedili* creció de forma lenta y reducida en todas las concentraciones de glucosa, siendo más acentuado el retardo a 60 % de glucosa en el medio. Una respuesta común a todas las cepas fue la reducción de su tamaño celular ante el incremento de la concentración de glucosa. Con base en las respuestas observadas, es posible sugerir que las cepas estudiadas de *C. apicola* y *C. cf. apicola* son osmotolerantes, las cuales con mayor probabilidad prevalecerán en sitios con altas concentraciones de azúcares como la miel. En contraparte, *M. koreensis* y *S. paphiopedili* no exhibieron características de osmotolerancia y es probable que sólo prosperen en el néctar floral en condiciones moderadas de concentración de azúcares.

ABSTRACT

Nectivorous yeasts are microorganisms associated with plant nectar. They are also present in the lifecycle of honey bees, specifically in food and honey inside the hive. Very limited data is available on the role these yeasts play in the transformation of nectar to honey. The first step in better understanding this dynamic is to determine yeast response to the progressive increase in sugar concentration in their growth medium caused by bees. This increase leads to a gradual rise in osmotic pressure between the cell and exterior medium allowing only osmotolerant organisms to survive. The objective of this thesis was to evaluate the effect of different glucose concentrations on the growth of yeasts present in floral nectar (*Metschnikowia koreensis* and *Sympodiomyces paphiopedili*) and bee (*Melipona beecheii*) honey (*Candida apicola* and *Candida cf. apicola*). Growth in each strain was estimated by generating calibration curves using spectrophotometric absorbance data and cell counts. An analysis was done of the effect of 2, 10, 20, 40 and 60% glucose content on yeast growth and cell morphology in liquid cultures. The resulting calibration curves provided adequate predictions of cell growth in the studied yeasts. All strains grew at the tested glucose concentrations, although the increase in medium concentration significantly reduced growth. *Candida apicola*, *C. cf. apicola* and *M. koreensis* grew rapidly at the different concentrations. *Sympodiomyces paphiopedili* grew slowly at all concentrations, the lowest rate being at the 60% concentration. These results suggest that *C. apicola* and *C. cf. apicola* are osmotolerant, meaning they are more probable to be present in high glucose concentration substances such as bee honey. In contrast, *M. koreensis* and *S. paphiopedili* are apparently not osmotolerant and probably grow only in moderate glucose concentration media such as floral nectar.

INTRODUCCIÓN

El néctar es una secreción azucarada que se produce en los nectarios de las flores, así como en los nectarios extraflorales (Bernadello, 2007; Nicolson y Thornburg, 2007; Percival, 1961) y tiene como función ser una recompensa nutritiva para los polinizadores, y en el caso de las abejas es colectado para su posterior transformación a miel (Polaino, 2006). Al ser uno de los primeros edulcorantes utilizados por la humanidad, la miel y sus procesos de transformación físico-química han sido objeto de estudio (González, 2008; Correa, 2004; Rodríguez y Gómez, 2004; Vit *et al.*, 1994). En el caso de las abejas melíferas (exceptuando avispa melífera), se considera que estos insectos son los únicos organismos involucrados en la transformación de néctar a miel. El proceso inicia con la colecta de néctar, el cual almacenan las abejas en su buche melífero, donde acontecen las primeras etapas de esta transformación y que continúa y finaliza en el nido (colmena) donde el néctar se almacena para su utilización posterior durante las épocas críticas de floración (Polaino, 2006; Ruiz-Argüeso y Rodríguez-Navarro, 1973).

La conversión de néctar en miel es un proceso complejo que engloba cambios físicos y químicos. Esta transformación involucra dos pasos esenciales, el primero es un rompimiento enzimático de los azúcares del néctar (Balasubramanyam, 2011; Persano-Oddo *et al.*, 1999), de tal forma que su composición originalmente rica en sacarosa, se transforma en una solución rica en glucosa y fructosa (cambios químicos). Esto sitúa a la miel y al néctar como dos sustancias diferentes en cuanto a la composición. La deshidratación gradual, es otro fenómeno que experimenta el néctar en el interior de la colmena y se logra a través de la ventilación y de la trofalaxis (Pérez y Farina, 2004; Hart y Ratnieks, 2002). La trofalaxis consiste en el intercambio de néctar entre las abejas obreras que resulta en la pérdida de agua (cambios físicos) (Park, 1925).

Actualmente, se tiene conocimiento de que esta transformación (néctar a miel) no solo involucra cambios físico-químicos, sino que también posiblemente involucra la participación de microorganismos que juegan un papel importante y hacen que el sistema no sea únicamente néctar-abejas-miel sino que algo más complejo (Moran *et al.*, 2012; Brysch-Herzberg, 2004; Gilliam, 1997; Gilliam *et al.*, 1990; Sandhu y Waraich, 1985; Gilliam *et al.*, 1974). En particular, ciertos hongos unicelulares denominados levaduras, han sido observados en el néctar de diversas especies de plantas, varias de ellas consideradas como melíferas (Pozo *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2009; Canto *et al.*, 2007;

Lachance *et al.*, 2001). Las levaduras también han sido detectadas en la miel y en sus estructuras de almacenamiento, en el propóleo, el polen, en la probóscide y saliva de las abejas, e incluso en su tracto intestinal (Carvalho *et al.*, 2005; Pimentel *et al.*, 2005; Brysch-Herzberg, 2004; Rosa *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 1999; Gilliam, 1997; Segui-Crespo *et al.*, 1991; Munitis *et al.*, 1976). Esto ocurre en varios grupos de abejas como *Apis mellifera* (Segui-Crespo *et al.*, 1991), *Bombus* spp. (Brysch-Herzberg, 2004) y meliponinos (abejas sin aguijón) (Rosa *et al.*, 2003).

Las asociaciones mutualistas con microorganismos que facilitan la alimentación de sus socios es algo conocido y se observa en las relaciones que establecen algunos hongos con termitas, avispas, hormigas y escarabajos, en donde su aporte se centra en una pre-digestión del alimento de estos insectos (Herrera y Ulloa, 1998). Históricamente, las relaciones mutualistas con microorganismos han tenido gran importancia evolutiva, al permitir el acceso a nutrientes antes limitados, a la colonización de nuevos sitios o proveer de protección contra patógenos mediante la producción de toxinas (Crotti *et al.*, 2010; Moran, 2006; Sapp, 2004). Respecto a las levaduras ligadas al néctar floral y a las abejas melíferas, se tiene conocimiento que pueden desdoblar, transformar y consumir los azúcares del néctar (Canto *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2008) e incluso transformar soluciones de sacarosa a soluciones con concentraciones de fructosa, glucosa y sacarosa similares a la miel (Kathiresan y Srinivasan, 2005).

Bajo estas evidencias, existe la hipótesis de que ciertos microorganismos, como las levaduras, están asociados a los procesos de alimentación de las abejas (Anderson *et al.*, 2011; Gilliam *et al.*, 1990), sin embargo, el conocimiento actual aún no ha logrado definir sus posibles efectos en la transformación de néctar a miel. Para ello, primero es necesario evaluar la respuesta de estas levaduras a incrementos progresivos en la concentración de azúcares, y esto es, porque inicialmente el néctar posee una concentración óptima para el crecimiento de microorganismos, pero durante su transformación a miel, esta concentración va en incremento y genera cada vez una mayor presión osmótica que afecta a la microbiota presente, persistiendo sólo organismos osmotolerantes. Esta información es importante porque mostrará cómo puede ser la dinámica de crecimiento de las levaduras durante la transformación de miel, lo cual permitirá analizar las relaciones que mantienen con su sitio de aislamiento. Por ello, como una forma de simulación del aumento de la concentración de azúcares en el proceso de néctar a miel, en este trabajo se evaluó la respuesta de levaduras del néctar y de la miel,

en medios con diferentes concentraciones de glucosa. Esta información es relevante porque estos hongos podrían impactar el proceso de formación de miel, la alimentación de las abejas y en un contexto amplio la apicultura y las interacciones que conectan flores, néctar y polinizadores.

ANTECEDENTES GENERALES

El néctar floral

El néctar floral es una secreción azucarada que producen las flores de ciertas plantas (principalmente angiospermas) y su lugar de síntesis es el nectario, el cual se localiza dentro de la flor (Brandenburg *et al.*, 2009; Bernadello, 2007; Pacini *et al.*, 2003). El néctar es una recompensa nutritiva que permite atraer visitantes florales, los cuales pueden facilitar la polinización y por ello se ha considerado un elemento esencial en las relaciones mutualistas y evolutivas entre plantas y animales (Heil, 2011; Brandenburg *et al.*, 2009). Es importante mencionar que la producción de néctar también ocurre en nectarios extraflorales, sin embargo, esta no se asocia directamente con el proceso de polinización (Pacini *et al.*, 2003; Adler, 2000).

La savia que ingresa al nectario a través del floema (a veces xilema) representa la materia prima para la formación de néctar (Pacini *et al.*, 2003; Adler, 2000) y aporta como principal azúcar la sacarosa (Brandenburg *et al.*, 2009). En el nectario, la sacarosa es dividida en glucosa y fructosa por enzimas invertasas que se presentan en las células del parénquima en sitios como la pared celular, el citoplasma y la vacuola (Sturm, 1999). Como consecuencia de esta fragmentación, el néctar floral siempre debería mostrar una relación estequiométrica 1:1 entre la glucosa y la fructosa (Percival, 1961). De esta forma, la composición y proporción de azúcares en un determinado néctar dependerá de las enzimas del nectario (Heil, 2011), es decir, a mayor cantidad y actividad de enzimas invertasas mayor será la proporción de glucosa y fructosa, y menor la de sacarosa.

El néctar está formado básicamente por agua y azúcares, pero también contiene otros elementos que lo hacen una solución compleja (Pacini *et al.*, 2003). El agua es el principal constituyente y está presente en porcentajes variables que pueden ser altos, hasta más del 70 % (Canto, 2011; CONABIO, 2008). La proporción restante del néctar, alrededor del 30 %, son solutos, de los cuales aproximadamente el 90 % lo constituyen los azúcares (Adler, 2000). Los tres azúcares que dominan en la mayoría de los néctares son sacarosa, fructosa y glucosa, y sus proporciones pueden variar entre las diferentes especies de plantas, lo que lleva a observar desde néctares enriquecidos en sacarosa hasta los enriquecidos en hexosas (Canto, 2011; Galetto y Bernadello, 2004; Percival, 1961). Otros azúcares que figuran en el néctar, aunque de forma minoritaria, son manosa,

xilosa, arabinosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, estaquiosa y sorbitol (Nicolson y Thornburg, 2007). El 10% restante de los solutos del néctar son elementos que existen en cantidades mínimas e incluyen iones inorgánicos, aminoácidos, proteínas (invertasas, tirosinasa, transglucosidasa, transfructosidasa, fosfatasas, etc.), lípidos, ácidos orgánicos (fumarato, malato, oxaloacetato, succinato, etc.) y ciertas toxinas (fenoles, alcaloides y terpenos) (Canto, 2011; Brandenburg *et al.*, 2009; Nicolson y Thornburg, 2007; Pacini *et al.*, 2003; Adler, 2000; Kearns e Inouye, 1993; Dafni, 1992), que en conjunto pueden conferir un olor y sabor particular, esencial en la atracción de los polinizadores.

La miel

La miel y sus características se originan a partir de dos procesos claves: la actividad enzimática sobre los azúcares del néctar (cambios químicos) y la deshidratación (cambios físicos). La transformación de néctar a miel inicia a partir de una solución acuosa con bajo contenido de solutos (néctar) hasta llegar a una sustancia donde la concentración de solutos (principalmente azúcares) se eleva gradualmente y existe una menor cantidad de agua (miel). Estos procesos, en especial la deshidratación, tienen la finalidad de mantener a la miel libre del crecimiento de microorganismos, y esto se logra gracias a la alta concentración de solutos que se genera y que resulta un ambiente poco favorable para su crecimiento (Polaino, 2006).

El néctar floral sirve de alimento a diversos animales, entre ellos a las abejas. Estos insectos consumen directamente el néctar o lo emplean para generar miel como alimento de reserva (Polaino, 2006; Güemes-Ricalde *et al.*, 2003). La miel se define como una sustancia dulce natural producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de otras partes vivas de la planta que las abejas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias y almacenan en sus panales, de los cuales se extrae el producto sin ninguna adición (Norma Oficial Mexicana, 01.11.00).

A diferencia del néctar, la miel contiene poca cantidad de agua que puede variar del 13 % al 25 % (Polaino, 2006). La proporción restante, corresponde a la fracción de sólidos, y de este grupo, los elementos mayoritarios son los azúcares reductores, de los cuales la glucosa y la fructosa pueden constituir hasta el 85 % de la fracción; la sacarosa también está presente pero su contenido no supera por lo general el 5 % de los sólidos. Adicionalmente, también existen otros azúcares como maltosa que pueden llegar a

representar hasta un 7 % y otro grupo de elementos como vitaminas, minerales y aminoácidos (CONABIO, 2008; Polaino, 2006; Vit *et al.*, 1998; Vit *et al.*, 1994).

La formación de miel inicia desde que el néctar se recolecta a través de la probóscide de las abejas y se almacena provisionalmente en el buche melífero. Desde esta etapa ocurre una modificación, ya que en ambos órganos se adicionan enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa. Al llegar al nido, las abejas obreras pasan su carga de néctar a las abejas receptoras, las cuales repiten este proceso (trofalaxis) hasta que la última deposita el néctar modificado en una celda del panal, donde la maduración continúa y se completa (CONABIO, 2008; Polaino, 2006; Persano-Oddo *et al.*, 1999). Por otra parte, la deshidratación del néctar se debe a la ventilación que generan las abejas al interior del nido y a la trofalaxis, ya que durante el intercambio el néctar queda expuesto a un ambiente seco que favorece la evaporación del agua (Park, 1925).

Características generales de las levaduras

Las levaduras son un grupo diverso de hongos caracterizados por ser unicelulares, aunque algunos forman cadenas conocidas como hifas y pseudohifas (Choudhary y Johri, 2009; Boekhout y Phaff, 2003; Herrera y Ulloa, 1998). El término "levadura" no representa un grupo taxonómico verdadero sino más bien práctico e incluye miembros sexuados de los phyla Ascomycota y Basidiomycota, así como levaduras sin fase sexual (Boekhout y Phaff, 2003). Las levaduras difieren de las algas por carecer de pigmentación, de los protozoos por su pared rígida e inmovilidad, y de las bacterias por ser eucariotas que poseen una pared celular de estructura química sencilla, una membrana celular con diferente composición química, además de la presencia de gemación y un mayor tamaño (Parés y Juárez, 2002). Barnett *et al.* (2007) reconocieron 678 especies y 93 géneros de levaduras, y recientemente Kurtzman *et al.* (2011) mencionan cerca de 1,500 especies agrupadas en 149 géneros, aunque se estima que existe un número mayor.

La forma y el tamaño celular de las levaduras son diversos. Existen células esféricas, elípticas, cilíndricas, claviformes, triangulares, etc., (Camacho *et al.*, 2009; Herrera y Ulloa, 1998; Walker, 1998). El tamaño es muy variable y va desde células con una longitud de 2 a 3 μm hasta otras de 20 a 50 μm ; el diámetro celular es menos variable y se sitúa entre 1 a 10 μm (Walker, 1998). Este polimorfismo asociado al sustrato, los nutrimentos y la edad del cultivo, fue la base para generar la clasificación de las

levaduras, ya que permitió diagnosticar algunos géneros y su forma de reproducción (Barnett *et al.*, 2007; Boekhout y Phaff, 2003). Actualmente, a pesar de la importancia de los métodos genéticos en la determinación de especies (Boundy-Mills, 2006; Carvalho *et al.*, 2005; Kurtzman *et al.*, 2003), la morfología celular adjunta a los rasgos reproductivos, fisiológicos y de asimilación bioquímica aún se consideran útiles en la identificación (Barnett *et al.*, 2007; Parés y Juárez, 2002; Herrera y Ulloa, 1998; Walker, 1998).

En las levaduras, la reproducción asexual tiene dos variantes: la gemación, que es el proceso más común de multiplicación, y la fisión, la cual es característica en los géneros *Dipodascus*, *Galactomyces* y *Schizosaccharomyces* (Kurtzman y Fell, 2006; Parés y Juárez, 2002; Herrera y Ulloa, 1998). Durante la gemación las nuevas células hijas (yemas) permanecen unidas a la célula madre formando cadenas que asemejan hifas (pseudohifas). Por otro lado, en la fisión, ocurre una duplicación de la célula progenitora (Herrera y Ulloa, 1998). En condiciones adversas, como es una baja disponibilidad de carbohidratos o de compuestos nitrogenados, la reproducción será de forma sexual y se observarán ascas y ascosporas endógenas (Ascomycota) o basidios y basidiosporas exógenas (Basidiomycota) (Boekhout y Phaff, 2003; Walker, 1998).

Las levaduras se distribuyen de forma natural en ambientes aéreos, terrestres, acuáticos e incluso en sitios extremos como los glaciares (Deak, 2006). Los hábitats terrestres abarcan climas húmedos y secos, cálidos, templados y fríos, y van desde el nivel del mar hasta alturas donde aún existe cubierta vegetal, por lo que toleran un amplio rango de temperaturas (-1 a 45° C) y de pH (3 a 11) (Choudhary y Johri, 2009; Shivaji y Prasad, 2009; Deak, 2006; Herrera y Ulloa, 1998). No obstante, en todos los hábitats, su distribución se limita a sitios donde están presentes azúcares, ya que al ser microbios heterótrofos dependen de un suministro externo de carbono orgánico para vivir, por ello es común hallarlos en frutas, hojas, semillas, canal digestivo de insectos y en el néctar floral y en la miel (Herrera y Ulloa, 1998; Lachance y Starmer, 1998).

Levaduras asociadas al néctar floral

La presencia de levaduras en el néctar se conoce desde hace mucho tiempo (Mrak y Phaff, 1948) y se asume que su transporte a las flores se debe a los insectos, entre ellos las abejas, las cuales también las transportan a sus nidos (Brown, 1976). Adler (2000) menciona que el néctar es susceptible a la degradación microbiana dado su naturaleza

líquida y a su composición que la convierten en una sustancia nutritiva. Entre los primeros estudios que reportaron la presencia de levaduras en flores están los de Tokuoka *et al.* (1987), quienes reconocieron nuevas especies del género *Candida*, y los de Sandhu y Waraich (1985) quienes también observaron cepas de *Candida*. Actualmente, diversos estudios han documentado este fenómeno en el néctar de un gran número de plantas e incluso en distintas regiones geográficas. Algunos reportes posibles de citar son los de Mushtaq *et al.* (2008, 2007 y 2006), Misra *et al.* (2011), Herrera *et al.* (2010, 2009 y 2008), De Vega *et al.* (2009) y Brysch-Herzberg (2004). En algún momento se llegó a especular que el néctar floral representaba un reservorio natural de levaduras (Kevan *et al.*, 1988).

Las primeras investigaciones sobre levaduras florícolas fueron cualitativas y se enfocaron principalmente en la identificación de las especies. Actualmente, los estudios han abordado un enfoque cuantitativo e incluso ecológico a fin de obtener un conocimiento más específico sobre su presencia en el néctar (Pozo *et al.*, 2011), y también sobre su impacto hacia los polinizadores (Pozo *et al.*, 2009), sin embargo, pocos hábitats naturales de levaduras han sido estudiados (Boekhout y Phaff, 2003).

La composición del néctar se regula mediante factores internos como la fisiología de la planta y mediante factores externos como la temperatura y la disponibilidad de agua y la presencia de polinizadores (Brysch-Herzberg, 2004). Pero, algunos resultados de investigación han demostrado que las levaduras puede consumir parcial o totalmente los azúcares del néctar, alterando la concentración y las proporciones iniciales (Herrera *et al.*, 2008; Canto *et al.*, 2008, 2007), y se ha sugerido que este hecho puede tener consecuencias ecológicas importantes sobre el comportamiento de los polinizadores en su búsqueda de néctar (Herrera *et al.*, 2008) afectando posiblemente el mutualismo planta-polinizador y sus beneficios asociados.

En la Península de Yucatán sólo existen tres estudios acerca de la presencia de levaduras en el néctar de las flores. Herrera *et al.* (2009) realizaron una exploración microscópica en el néctar de diversas plantas de la región, encontrando poblaciones de levaduras con altas densidades celulares. Lizama (2011) al estudiar el néctar floral de *Gymnopodium floribundum*, *Piscidia piscipula* y *Tecoma stans*, de igual forma detectó altas densidades celulares de levaduras. Canto y Herrera (2012) identificaron en el néctar de *Tecoma stans* y *Merremia aegyptia* dos de las especies de levaduras a estudiar en esta tesis, *Metschnikowia koreensis* y *Sympodiomyces paphiopedili*.

Microorganismos vinculados a la miel: énfasis en levaduras

En la miel, se han observado de forma natural un grupo diverso de microorganismos como son: hongos, mohos, bacterias, enterobacterias (Salamanca-Grosso *et al.*, 2001; Gilliam *et al.*, 1990; Ruiz-Argüeso y Rodríguez-Navarro, 1973) y levaduras (Marvin *et al.*, 1931), y las primeras investigaciones sobre la presencia de estos microorganismos en la miel estaban dirigidas a identificar los agentes causantes de su contaminación y fermentación (Marvin *et al.*, 1931).

Entre los estudios sobre levaduras asociadas a las abejas y en específico a la miel, se pueden citar los realizados por Carvalho *et al.* (2010), Pimentel *et al.* (2005), Brysch-Herzberg, (2004), Rosa *et al.* (2003), Teixeira *et al.* (2003), Pérez-Sánchez *et al.* (1997) y Marvin *et al.* (1931). Algunos de los géneros de levaduras comúnmente observados en la miel son *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*, entre otras. No todos los microorganismos pueden prosperar en la miel, por lo que una de las principales características identificadas en estas levaduras, es su capacidad para crecer en concentraciones elevadas de azúcares (Munitis *et al.*, 1976); el incremento en la concentración de azúcares en la miel ocurre gradualmente con su maduración dentro de los sitios de su almacenaje en la colmena.

La causa común de contaminación de la miel por levaduras se atribuye a las abejas y se menciona que estos hongos están naturalmente asociados a estos insectos (Marvin *et al.*, 1931). Además, en años recientes se ha demostrado que estos hongos unicelulares se presentan en la probóscide de las abejas (Canto *et al.*, 2008; Brysch-Herzberg, 2004) e incluso en su tracto intestinal (Gilliam, 1997; Gilliam *et al.*, 1974).

Algunos autores plantean que las levaduras asociadas a las abejas pueden realizar una pre-digestión de los alimentos como el polen, generando un efecto positivo. No obstante, en relación a la miel, casi nada hay documentado, a excepción de Kathiresan y Srinivasan (2005) quienes mencionan que las levaduras participan en su proceso de maduración. Recientemente, Anderson *et al.* (2011) propusieron que los microorganismos presentes en la colmena, posiblemente han establecido una relación de simbiosis con las abejas y participan tanto en su nutrición como en su defensa contra patógenos, sin embargo, mencionan que poco se sabe sobre sus requerimientos y necesidades.

En la Península de Yucatán, uno de los trabajos pioneros sobre la presencia de levaduras en la miel es el de Lizama (2011), quien encontró altas densidades celulares en

la ánforas llenas (maduras) y semi-llenas (inmaduras) de miel de la abeja sin aguijón *Melipona beecheii*, y entre las especies que observó están *Candida apicola* y *C. cf. apicola*, la cual fue estudiada en esta tesis.

Levaduras tolerantes a altas concentraciones de azúcares

La mayoría de las levaduras crecen en ambientes donde los azúcares se encuentran disponibles y su concentración es relativamente baja (por ejemplo 2 %) (Lachance y Starmer, 1998), no obstante, sólo ciertas especies lo hacen cuando la concentración de estos solutos es alta (Anand y Brown, 1968; Lochhead y Landerkin, 1942). La primera clasificación de estas levaduras se debe a Richter (1912, ver Tokuoka, 1993), quién designó como "osmofílico" al grupo de especies que crecen soportando presiones osmóticas elevadas. De allí en adelante, las levaduras tolerantes a altas concentraciones de sales y de azúcares se les nombró organismos osmofílicos u osmotolerantes (Tekolo *et al.*, 2010; Tokuoka, 1993; Munitis *et al.*, 1976).

Sin embargo, la respuesta de tolerancia difiere entre las soluciones concentradas de sales y de azúcares y por ello algunos autores sugieren reconocer dos grupos: levaduras tolerantes al azúcar y levaduras tolerantes a la sal (Tokuoka, 1993; Brown, 1976). Asimismo, el término osmofílico se ha calificado como impreciso, ya que trata de explicar el crecimiento con base a relaciones hídricas y no contempla otros factores asociados como el tipo y concentración del soluto, o la temperatura (Tekolo *et al.*, 2010; Tokuoka, 1993; Anand y Brown, 1968). La crítica más importante es que muchas levaduras denominadas osmofílicas sólo toleran las soluciones concentradas, más que necesitar de este medio para crecer (Tokuoka, 1993; Brown y Simpson, 1972; Anand y Brown, 1968). Sin embargo, Munitis *et al.* (1976) observaron que *Saccharomyces bisporus* var. *mellis* sólo tuvo un óptimo crecimiento a 60 % de glucosa. Se ha propuesto que el adjetivo xerotolerante resultaría más apropiado (Deak, 2006; Grant, 2004; Brown, 1976). En la presente tesis se usará el término de "levaduras osmotolerantes" para definir específicamente a aquellas que tienen la habilidad de vivir e incluso crecer en condiciones de alta concentración de azúcares (Tokuoka, 1993; Anand y Brown, 1968).

En la literatura existen diferentes criterios sobre las concentraciones de azúcares en las cuales sólo pueden crecer e identificarse levaduras osmotolerantes. Algunos señalan que éstas prosperan en diferentes concentraciones de glucosa variando entre los

50-70 % (Barnett *et al.*, 2007), 50-60 % (Kurtzman *et al.*, 2003), 40-70 % (Lodder 1970, citado en Ok y Hashinaga, 1997), mientras que otros indican un crecimiento sólo en 50 % de glucosa (Kreger-van, 1984), o arriba de 65 % de sacarosa (Scarr y Rose, 1966); otros proponen clasificaciones más específicas, como Ok y Hashinaga (1997), quienes señalan tres grupos: el primero muestra un bajo crecimiento en 1 % de glucosa, pero en 30 % y 40 % este es muy superior; el segundo crece en 1 %, 10 % y 20 % de glucosa, y el tercero sólo muestra un máximo crecimiento en concentraciones menores del 10 %. El criterio adoptado en este trabajo para clasificar las cepas como osmotolerantes fue el de Kurtzman *et al.* (2003).

La elevada concentración de solutos genera una alta presión osmótica para los microorganismos y reduce la disponibilidad de agua. Ésta última generalmente se expresa en términos de la actividad del agua o "aw" (agua pura, aw = 1) (Deak, 2006; Grant, 2004) y ha sido útil para distinguir a las cepas osmotolerantes. La mayoría de las levaduras crece bien cuando la actividad del agua es de 0.90 a 0.95 (Fleet, 2011; Deak, 2006), pero las cepas tolerantes logran crecer a valores más bajos (*i. e.* menos agua disponible), y su rango de actividad del agua es amplio, variando del 0.65 al 0.85 (Fleet, 2011; Deak, 2003; Stratford y James, 2003; Tokuoka, 1993; Stanier *et al.*, 1976; Anand y Brown, 1968).

La habilidad de crecer en soluciones concentradas de azúcares y sales requiere estrategias que contrarrestan los efectos negativos de la elevada presión osmótica. Entre estas estrategias sobresale la acumulación intracelular de polialcoholes como glicerol y arabitol (Tekolo *et al.*, 2010; Brown y Simpson, 1972), los cuales mantienen la integridad y actividad de las enzimas, y elevan la presión osmótica interna hasta igualar la externa, evitando perder agua del citoplasma (Tokuoka, 1993; Brown, 1976; Stanier *et al.*, 1976); en general estas moléculas se denominan "solutos compatibles" (Grant, 2004; Brown, 1976). Otras adaptaciones que muestran las levaduras son cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana celular y en los mecanismos de transporte activo que ayudan a mantener bajas concentraciones intracelulares de solutos (Tokuoka, 1993).

Entre los principales géneros que presentan levaduras osmotolerantes destacan el género *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* y *Candida* (Ok y Hashinaga, 1997; Tokuoka, 1993; Munitis *et al.*, 1976). En este último género, se han identificado varias especies, entre ellas a *C. apicola* (Ok y Hashinaga, 1997; Tokuoka, 1993; Scarr y Rose, 1966; Lochhead y Landerkin, 1942), la cual se ha reportado que tolera concentraciones de glucosa de 50 % y 60 % (Hajsig, 1958).

Crecimiento microbiano: características y formas de estimación

El crecimiento microbiano, es decir, el incremento del número de microorganismos en el tiempo, se considera la causa común del deterioro de los alimentos pero también puede generar metabolitos útiles para la salud y la alimentación humana (Barreiro y Sandoval, 2006). Por ello, existe interés de estudiar sus características y los factores que regulan su metabolismo (temperatura, pH, concentración de nutrientes, oxígeno, etc.) a fin, de lograr su comprensión y manipulación. El crecimiento microbiano incluye cuatro fases, las cuales se enlistan a continuación (Peleg y Corradini, 2011; Quintero-Ramírez, 1981):

Fase de latencia o fase lag: Fase en la que ocurre una adecuación a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. La multiplicación celular es lenta, las células incrementan su biomasa y la energía principalmente sirve para sintetizar enzimas. Si el microorganismo está en fase exponencial antes de inocularse, la fase *lag* es breve o puede no existir.

Fase exponencial o logarítmica: El microorganismo está adaptado al nuevo medio, se multiplica a su máxima velocidad y su crecimiento es cuantificable por el número de células producidas a través del tiempo. El uso del sustrato y la secreción de metabolitos alteran el medio, no obstante, la velocidad de crecimiento es constante y su duración depende de la concentración inicial del sustrato.

Fase estacionaria: En esta fase, la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte, lo que lleva a un equilibrio celular. La biomasa aumenta gradualmente o permanece constante debido a la falta de nutrientes, la acumulación de productos inhibitorios (tóxicos) o algún cambio fisicoquímico.

Fase de muerte: Inicia cuando los nutrimentos y las reservas de energía celular se agotan y son insuficientes para la supervivencia del microorganismo, sumado a la acumulación de sustancias tóxicas, que en conjunto impiden su reproducción y llevan a su muerte.

Los métodos desarrollados para estimar el crecimiento pueden clasificarse como directos e indirectos. La forma directa más común consiste en el conteo de células bajo un microscopio utilizando una cámara Neubauer (*i. e.* densidad celular). Este es un método económico y rápido (con pocas muestras) y que además permite observar el estado fisiológico de las células (vivas, muertas) mediante una tinción (Becker *et al.*, 1990). Otra opción es enumerar las unidades formadoras de colonia (UFC) o células viables, que

resultan de cultivar sobre medio sólido un volumen conocido de la suspensión celular de interés (Becker *et al.*, 1990). El primer enfoque se señala como un método muy preciso (Baty *et al.*, 2002; Pringle y Mor, 1975).

Las vías indirectas estiman la densidad celular por medios ópticos y su principio se basa en las interacciones que tienen las células en suspensión con un haz de luz, como puede ser la desviación de la luz (nefelometría), su absorción (absorbancia, densidad óptica), o su transmisión (transmitancia), siendo su magnitud (hasta cierto límite) proporcional a la concentración celular (Pringle y Mor, 1975). Son métodos rápidos, confiables bajo ciertas consideraciones y permiten trabajar con múltiples muestras (Horáková *et al.*, 2004). El peso seco también es una vía indirecta de estimación (Becker *et al.*, 1990).

El estudio de la cinética del crecimiento microbiano surge del interés de conocer y hacer eficientes los procesos de fermentación (Quintero-Ramírez, 1981). La comprensión del comportamiento del crecimiento en función del tiempo, permitió identificar cuando se producía la mayor cantidad de biomasa o metabolitos.

Algunas variables de estudio en la cinética de crecimiento son: a) la *velocidad de crecimiento*, la cual es el aumento en la cantidad de células por unidad de tiempo, sus unidades son g/L/hora; es proporcional al número de células presentes y alcanza un valor máximo y constante siempre que no exista un sustrato limitante, como en la fase exponencial. b) el *tiempo de duplicación*, es el tiempo necesario para que la población celular se duplique y es constante en la fase exponencial. c) la *velocidad específica de crecimiento*, es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo (h), siendo constante en la fase exponencial, y en la curva de crecimiento se representa por la pendiente de la línea y d) la *velocidad específica máxima de crecimiento*, que es la que puede alcanzar el microorganismo bajo las condiciones prevalentes.

Sistema de estudio

Miel de Melipona beecheii (tribu Meliponini). Esta abeja sin aguijón es la más importante en la meliponicultura por su volumen de producción. Se considera de fácil manejo por su carencia de aguijón y baja conducta defensiva. Su miel difiere a la de *Apis mellifera* en las siguientes características: a) un alto contenido de humedad (24.5 g/100g miel), b) una mayor acidez (77.83 meq/kg miel), una menor cantidad de los azúcares reductores

glucosa (27.57 g/100g miel) y fructosa (31.95 g/100g miel) y un contenido mayor de sacarosa (9.12 g/100g miel) (Vit *et al.*, 2006). La miel de *M. beecheii* se almacena en estructuras denominadas potes que se elaboran con cerumen (mezcla de cera y resina) y no en panales de cera como ocurre en la abeja europea. La cantidad de miel obtenida por cosecha va de 1-3 kg, mientras que en *A. mellifera* se obtienen de 10-15 kg. Se ha atribuido a la miel de *M. beecheii* características antimicrobianas (Quezada-Euán, 2005).

Néctar floral de Tecoma stans (L.) Juss (Bignoniaceae). Este arbusto o árbol pequeño conocido en lengua maya como xk'anlool se considera una planta melífera en la región. Crece comúnmente en áreas de vegetación secundaria y florece de septiembre a mayo e incluso todo el año. Las inflorescencias llevan flores tubulares, amarillas y fragantes, y los nectarios internos producen en promedio de 20 a 30 μl de néctar ($0.57 \pm 0.26 \mu\text{l}$) (Lizama, 2011). Los azúcares presentes en el néctar son glucosa (79.1 mg/mL), fructosa (79.8 mg/mL) y sacarosa (5.6 mg/mL).

Néctar floral de Merremia aegyptia (Convolvulaceae). Esta enredadera es una importante fuente de néctar para las abejas en los meses de octubre a enero cuando la floración es baja en la vegetación. Crece en áreas de vegetación secundaria y en selvas perenifolias y caducifolias. Las inflorescencias llevan flores de forma sub-campanulada, blancas y con pelos amarillos en el pedúnculo. Los nectarios internos producen en promedio $0.61 \pm 0.41 \mu\text{l}$ de néctar y los azúcares que se presentan son glucosa (102.4 mg/mL), fructosa (102.1 mg/mL) y sacarosa (111.1 mg/mL).

Especies de levaduras aisladas en néctar y miel en Yucatán

Candida apicola y *C. cf. apicola*. Pertenece a los ascomicetos y se caracteriza por presentar células esféricas a ovoides, aisladas o en pares, sin formación de pseudomicelio, su gemación es polar, no poseen reproducción sexual, desarrollan colonias de color blanco. En este trabajo se estudió una cepa de *C. apicola* procedente de la miel madura de *M. beecheii* y una cepa de *C. cf. apicola* procedente de la miel inmadura de *M. beecheii*, ambas de la colección de levaduras CICY-RN con números de registro 11 y 1, respectivamente.

Metschnikowia koreensis. Esta especie de ascomiceto posee células elipsoidales a cilíndricas cortas, aisladas o en cadena cortas, gemación multilateral, pseudohifas poco desarrolladas o ausentes, desarrollan colonias de color blanco. Posee reproducción

sexual. En este trabajo se estudió una cepa proveniente de la colección de levaduras silvestres CICY-RN con número de registro 35 y fue aislada del néctar floral de *T. stans*.

Sympodiomyces paphiopedili. Esta especie se incluye en los basidiomicetos y presenta células ovoides, elongadas, subglobosas, aisladas, en pares o en cadenas cortas; en ocasiones forma micelio. Presenta gemación lateral y no existe reproducción sexual. Forma colonias de color crema. En este trabajo se estudió una cepa de esta especie, que proviene de la colección de levaduras silvestres CICY-RN con número de registro 209 y fue aislada del néctar floral de *M. aegyptia*.

JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia de que la miel, las abejas y el néctar floral albergan levaduras de forma natural, no obstante, pocos estudios han explorado que características les permiten colonizar un sitio u otro. La cadena de transformación de néctar a miel trae consigo incrementos en la concentración de azúcares y desconocemos el impacto de este tipo de presiones selectivas en las levaduras ligadas a esta cadena; por ello, en este trabajo se exploran las respuestas mostradas por estos microorganismos bajo un gradiente de concentración de azúcar. En específico, se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de glucosa en el crecimiento y la morfología celular, en dos cepas obtenidas de la miel de *Melipona beecheii* y dos cepas del néctar de plantas melíferas (*Tecoma stans* y *Merremia aegyptia*). Esta información es relevante porque estos hongos podrían impactar el proceso de formación de miel, la alimentación de las abejas y en un contexto amplio la apicultura y las interacciones que conectan flores, néctar y polinizadores.

HIPÓTESIS

Al ser el néctar un sustrato con menor concentración de azúcares que la miel, la cual es un sustrato extremo con alta concentración, se asume que:

- Las levaduras que prevalecen en el néctar y aisladas de éste, tendrán un crecimiento limitado, al contrario de las aisladas en la miel en condiciones de alta concentración de azúcares.
- Las levaduras aisladas de la miel al estar adaptadas a concentraciones elevadas de azúcar, tendrán un mayor crecimiento en comparación con las levaduras del néctar, al incrementarse la concentración de azúcares.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto que ejercen diferentes concentraciones de glucosa sobre levaduras del néctar de las plantas melíferas *Tecoma stans* y *Merremia aegyptia*, y sobre levaduras de la miel madura e inmadura de la abeja *Melipona beecheii*.

Objetivos específicos

- Caracterizar la morfología de las colonias de *M. koreensis*, *S. paphiopedili*, *C. apicola* y *C. cf. apicola*.
- Generar curvas de calibración mediante conteos celulares y lecturas de absorbancia en *M. koreensis*, *S. paphiopedili* y *C. cf. apicola*.
- Documentar la cinética de crecimiento de *M. koreensis*, *S. paphiopedili*, *C. apicola* y *C. cf. apicola* en medios de cultivo líquido con concentraciones de 2 %, 10 %, 20 %, 40 % y 60 % de glucosa.
- Estudiar la morfología, longitud y diámetro celular de *M. koreensis*, *S. paphiopedili*, *C. apicola* y *C. cf. apicola* en medios de cultivo líquido con concentraciones de 2 %, 10 %, 20 %, 40 % y 60 % de glucosa.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

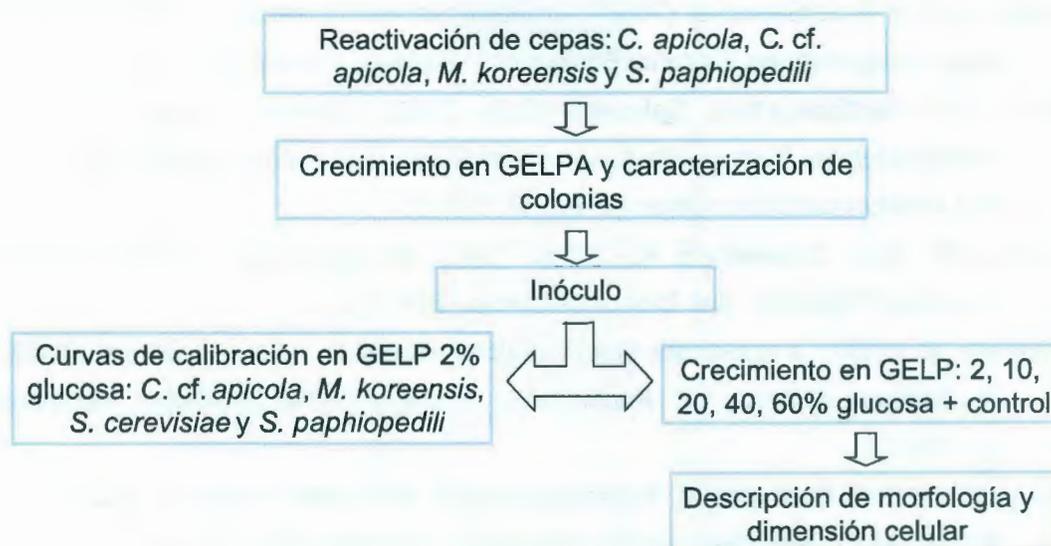


Figura 1. Esquema simplificado de la estrategia experimental. La fase inicial del estudio correspondió a la reactivación de las cepas en estado de preservación mediante su cultivo en GELPA. Posteriormente se realizó la caracterización macroscópica y el material biológico obtenido sirvió de inóculo en los experimentos de curvas de calibración y el crecimiento bajo diferentes concentraciones de glucosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, L. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 91, 409-420.
- Anand, J. C. y A. D. Brown (1968). Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, 52, 205-212.
- Anderson, K. E., T. H. Sheehan, B. J. Eckholm, B. M. Mott y G. Hoffman (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58, 431-444.
- Balasubramanyam, M. V. (2011). Role of invertase enzyme in ripening of honey of indigenous hive honeybee *Apis cerana indica*. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 1 section B, 322-327.

- Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow (2007). *Yeasts: Characteristic and Identification*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kindom. 1139 p.
- Barreiro, J. A. y A. J. Sandoval (2006). *Operaciones de Conservación de Alimentos por Bajas Temperaturas*. Editorial Equinoccio. Caracas, Venezuela. 359 p.
- Baty, F., J. P. Flandrois y M. L. Delignette-Muller (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5816-5825.
- Becker, J. M., G. A. Caldwell y E. A. Zachgo (1990). *Biotechnology: a Laboratory Course*. Academic Press Inc. San Diego, California, USA. 232 p.
- Bernadello, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries, en: *Nectaries and Nectar*, S. W. Nicolson, M. Nepi, y E. Pacini (eds.). Springer-Verlag. Dordrecht, Netherlands. pp. 19-128.
- Boekhout T. y H. J. Phaff (2003). Yeast biodiversity, en: *Yeast in Food*, T. Boekhout y V. Robert (eds.). Woodhead Publishing Limited. Neusäss, Germany. pp. 1-38.
- Boundy-Mills, K. (2006). Methods for investigating yeast biodiversity, en: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, C. Rosa y P. Gábor (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 67-100.
- Brandenburg, A., A. Dell'Olivo , R. Bshary y C. Kuhlemeier (2009). The sweetest thing. *Advances in nectar research. Current Opinion in Plant Biology*, 12, 486-490.
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, 40, 803-846.
- Brown, A. D. y J. R. Simpson (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Journal of General Microbiology*, 72, 589-591.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 87-100.
- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. Manual de la Facultad de Química, UNAM. México, D. F., México. 9 p.
- Canto, A. (2011). El néctar, la esencia de la miel, en: *La miel y las Abejas*. El Dulce Convenio del Mayab, C. Echazarreta (ed.). Gobierno del Estado de Yucatán. Biblioteca Básica de Yucatán. pp. 61-72.
- Canto, A. y C. M. Herrera (2012). Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. *Annals of Botany*, 110, 1173-1183.

- Canto, A., C. M. Herrera, M. Medrano, R. Pérez e I. M. García (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.
- Canto, A., R. Pérez, M. Medrano, M. C. Castellanos y C. M. Herrera (2007). Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species (Ranunculaceae): contrasting patterns under field and glasshouse conditions. *Annals of Botany*, 99, 653-660.
- Carvalho, C. M., A. Rocha, M. L. F. Estevinho y A. Choupina (2005). Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 11-17.
- Carvalho, C. M., S. Meirinho, M. L. F. Estevinho y A. Choupina (2010). Yeast species associated with honey: different identification methods. *Archivos de Zootecnia*, 59, 103-113.
- Choudhary, D. K. y B. N. Johri (2009). Basidiomycetous yeasts: current status, en: *Yeast Biotechnology. Diversity and Applications*, T. Satyanarayana y G. Kunze (eds.). Springer-Verlag. Netherlands. pp. 19-46.
- CONABIO (2008). Mieles Peninsulares y diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Corredor Biológico Mesoamericano-México. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusión/carteles/carteles.html>. [Acceso 10 Agosto 2012].
- Correa, A. (2004). Historia de la apicultura en México. *Imagen Veterinaria*, 4, 4-9.
- Crotti, E., A. Rizzi, B. Chouaia, I. Ricci, G. Favia, A. Alma, L. Sacchi, K. Bourtzis, M. Mandrioli, A. Cherif, C. Bandi y D. Daffonchio (2010). Acetic acid bacteria newly emerging symbionts of insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 6963-6970.
- Dafni, A. (1992). *Pollination Ecology. A Practical Approach*. Oxford University Press. Oxford. 250 p.
- Deak, T. (2003). Detection, enumeration and isolation of yeasts, en: *Yeast in Food*, T. Boekhout y V. Robert (eds.). Woodhead Publishing Limited. Neusäss, Germany. pp. 39-68.

- Deak, T. (2006). Environmental factors influencing yeasts, en: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, C. Rosa y P. Gábor (eds.). Springer-Verlag. Berlín, Germany. pp. 154-174.
- De Vega, C., C. M. Herrera y S. D. Johnson (2009). Yeasts in floral nectar of some South African plants: quantification and associations with pollinator type and sugar concentration. *South African Journal of Botany*, 75, 798-806.
- Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages, en: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, C. P. Kurtzman, J. P. Fell y T. Boekhout (eds.). Elsevier. New York, USA. pp. 53-64.
- Galetto, L. y G. Bernadello (2004). Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*, 94, 269-280.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Gilliam, M., D. W. Roubik y B. J. Lorenz (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21, 89-97.
- Gilliam, M., L. J. Wickerham, H. L. Morton y R. Martin (1974). Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24, 349-356.
- González, A. J. (2008). *Cría y Manejo de las Abejas Nativas sin Aguijón en México*. Universidad Autónoma de Yucatán. Secretaria de Fomento Agropecuario y Pesquero. Dirección Estatal de Apicultura. Gobierno del Estado de Yucatán. Planeta Impresores S.A. de C.V. Mérida, Yucatán, México. 177 p.
- Grant, W. D. (2004). Life at lower water activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 359, 1249-1267.
- Güemes-Ricalde, F. J., C. Echazarreta-González, R. Villanueva, J. M. Pat-Fernández y R. Gómez-Álvarez (2003). La apicultura en la Península de Yucatán. Actividad de subsistencia en un entorno globalizado. *Revista Mexicana del Caribe*, 16, 117-132.
- Hajsig, M. (1958). *Torulopsis apicola* nov. spec., new isolates from bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 24, 18-22.
- Hart, A. y F. Ratnieks (2002). Task-partitioned nectar transfer in stingless bees: work organisation in a phylogenetic context. *Economical Entomology*, 27, 163-168.

- Heil, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, 16, 191-200.
- Herrera, C. M., A. Canto, M. I. Pozo y P. Bazaga (2010). Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 747-754.
- Herrera, C. M., C. de Vega, A. Canto y M. I. Pozo (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Herrera, C. M., I. M. García y R. Pérez (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumblebee-pollinated plants. *Ecology*, 89, 2369-2376.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). *El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada*. Fondo de Cultura Económica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 552 p.
- Horáková, K., M. Greifová, Z. Seemannová, B. Gondová y G. M. Wyatt (2004). A comparison of the traditional method of counting viable cells and a quick microplate method for monitoring the growth characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 181-184.
- Kathiresan, K. y K. Srinivasan (2005). Making artificial honey using yeast cells from salivary glands of honey bees. *Indian Journal of Experimental Biology*, 3, 664-666.
- Kearns, C. y D. Inouye (1993). *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado. Colorado, USA. 583 p.
- Kevan, P. G., D. Eisikowitch, S. Fowle y K. Thomas (1988). Yeast-contaminated nectar and its effects on bee foraging. *Journal of Apicultural Research*, 27, 26-29.
- Kreger-van, N. (1984). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier Science Publishers. Groningen, Netherlands. 1082 p.
- Kurtzman, C. P., T. Boekhout, V. Robert, J. W. Fell y T. Deak (2003). Methods to identify yeasts, en: *Yeast in Food*, T. Boekhout y V. Robert (eds.). Woodhead Publishing Limited. Neusäss, Germany. pp. 69-121.
- Kurtzman, C. P. y J. W. Fell (2006). Yeast Systematics and Phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology, en: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, C. Rosa y P. Gábor (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Germany. pp. 11-30.

- Kurtzman, C. P., J. P. Fell y T. Boekhout (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeasts, en: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, C. P. Kurtzman, J. P. Fell y T. Boekhout (eds.). Elsevier. New York, USA. pp. 3-8.
- Lachance, M. A. y W. T. Starmer (1998). Ecology and yeasts, en: *The Yeasts. A Taxonomic Study*, C. P. Kurtzman y J. W. Fell (eds.). Elsevier. Amsterdam, Netherlands. pp. 21-32.
- Lachance, M. A., W. T. Starmer, C. A. Rosa, J. M. Bowles, J. S. F. Barker y D. H. Janzen (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 1, 1-8.
- Lizama, B. (2011). Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 77 p.
- Lochhead, A. G. y G. B. Landerkin (1942). Nutrilite requirements of osmophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 44, 343-351.
- Marvin, G. E., W. H. Peterson, E. B. Fred y H. F. Wilson (1931). Some of the characteristics of yeasts found in fermenting honey. *Journal of Agricultural Research*, 43, 121-131.
- Misra, S., S. Raghuwanshi, P. Gupta, K. Dutt y R. K. Saxena (2011). Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 393-402.
- Moran, N. A. (2006). Symbiosis. *Current Biology*, 16, R866-R871.
- Moran, N. A., A. K. Hansen, J. Elijah Powell y Z. L. Sabree (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PloS ONE*, 7, e36393.
- Mrak, E. M. y H. J. Phaff (1948). Yeasts. *Annual Reviews Microbiology*, 2, 1-46.
- Munitis, M. T., E. Cabrera y A. Rodríguez-Navarro (1976). An obligate osmophilic yeast from honey. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 320-323.
- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2006). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Bombax cieba* and *Canna indica* flower. *Pakistan Journal Botany*, 38, 1279-1288.
- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2007). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ixora coccinea* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 39, 1367-1376.

- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2008). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Malvaviscus arboreus* and *Pancratium biflorum* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 40, 877-885.
- Nicolson, S. W. y R. W. Thornburg (2007). Nectar chemistry, en: *Nectaries and Nectar*, S. W. Nicolson, M. Nepi, y E. Pacini (eds.). Springer-Verlag. Dordrecht, Netherlands. pp. 215-264.
- Norma Oficial Mexicana 01.11.00 NOM-145-SCFI-2000. *Información Comercial-Etiquetado de Miel en sus Diferentes Presentaciones*. Diario oficial de la Federación, México, D.F., México. 4 p.
- Pacini, E., M. Nepi y J. L. Vesprini (2003). Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, 238, 7-21.
- Parés, R. y A. Juárez (2002). *Bioquímica de los Microorganismos*. Editorial Reverté. Barcelona, España. 404 p.
- Park, W. (1925). The storing and ripening of honey by honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 18, 405-410.
- Peleg, M. y M. G. Corradini (2011). Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 917-945.
- Percival, M. (1961). Types of nectar in Angiosperms. *New Phytologist*, 60, 235-281.
- Pérez-Sánchez, M. C., F. del Baño-Breis, M. E. Candela-Castillo y C. Egea-Gilabet (1997). Flora microbiana en mieles de la región de Murcia, España. *Anales de Biología*, 22 (Biología Molecular y Microbiana), 155-164.
- Persano-Oddo, L., M. Gioia-Piazza y P. Pulcini (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30, 57-65.
- Pimentel, M. R. C., Y. Antonini, R. P. Martins, M. A. Lachance, y C. A. Rosa (2005). *Candida riodecensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Stamerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*, 5, 875-879.
- Pírez, N. y W. Farina (2004). Nectar-receiver behavior in relation to the reward rate experienced by foraging honeybees. *Behavioral Ecological and Sociobiology*, 55, 574-582.
- Polaino, C. (2006). *Manual Práctico del Apicultor*. Editorial Cultural S. A. Madrid, España. 528 p.

- Pozo, M. I., C. de Vega, A. Canto y C. M. Herrera (2009). Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions. *Plant Signaling and Behavior*, 4, 1-3.
- Pozo, M. I., C. M. Herrera y P. Bazaga (2011). Species richness of yeast communities in floral nectar of southern spanish plants. *Microbial Ecology*, 61, 82-91.
- Pringle, J. R. y J. R. Mor (1975). Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem, en: *Methods in Cell Biology*. Volume XI Yeast Cells, D. M. Prescott (ed.). Academic Press. New York, USA. pp. 131-168.
- Quezada-Euán, J. (2005). *Biología y Uso de las Abejas sin Aguijón de la Península de Yucatán, México (Hymenoptera: Meliponini)*. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 45 p.
- Quintero-Ramírez, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones*. Editorial Alhambra-Mexicana. México. D.F., México. 332 p.
- Rodríguez, B. y M. Gómez (2004). Estado actual de la abeja maya: *Melipona beecheii*. *Imagen Veterinaria*, 4, 22-26.
- Rosa, C. A., E. M. Viana, R. P. Martins, Y. Antonini y M. A. Lachance (1999). *Candida batistae*, a new yeast species associated with solitary digger nesting bees in Brazil. *Mycologia*, 91, 428-433.
- Rosa, C. A., M. A. Lachance, J. O. C. Silva, A. C. P. Teixeira, M. M. Marini, Y. Antonini y R. P. Martins (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4, 271-275.
- Ruiz-Argüeso, T. y A. Rodríguez-Navarro (1973). Gluconic acid-producing bacteria from honey bees and ripening honey. *Journal of General Microbiology*, 76, 211-216.
- Salamanca-Grosso, G., C. A. Henao-Rojas, G. I. Moreno y A. Luna (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. Disponible en: http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/caracteristicas_microbiologicas_mieles.htm [Acceso 10 Agosto 2012].
- Sandhu, D. K. y M. K. Waraich (1985). Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microbial Ecology*, 11, 51-58.
- Sapp, J. (2004). The dynamics of symbiosis: an historical overview. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1046-1056.
- Scarr, M. P. y D. Rose (1966). Study of osmophilic yeasts producing invertase. *Journal of General Microbiology*, 45, 9-16.

- Segui-Crespo, D., C. Betancourt, A. Berrios, O. Pérez-Laguillo y D. Pesante (1991). Catastro de levaduras presentes en colmenas de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) en el área oeste de Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 27, 198-200.
- Shivaji, S. y G. S. Prasad (2009). Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications, en: *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, T. Satyanarayana y G. Kunze (eds.). Springer. Netherlands. pp. 3-18.
- Stanier, R. Y., E. A. Adelberg y J. L. Indraham (1976). *The Microbial World*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA. 30 p.
- Stratford, M y S. A. James (2003). Non-alcoholic beverages and yeasts, en: *Yeast in Food*, T. Boekhout y V. Robert (eds.). Woodhead Publishing Limited. Neusäss, Germany. pp. 309-345.
- Sturm, A. (1999). Invertases: primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*, 121, 1-7.
- Ok, T. y F. Hashinaga (1997). Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 39-47.
- Teixeira, A. C. P., M. M. Marini, J. R. Nicoli, Y. Antonini, R. P. Martins, M. A. Lachance y C. A. Rosa (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Tekolo, O. M., J. Mackenzie, A. Botha y B. A. Prior (2010). The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 10, 482-491.
- Tokuoka, K. (1993). Sugar-and-salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 101-110.
- Tokuoka, K., T. Ishitani, S. Goto, y K. Komagata (1987). Four new yeast species belonging to the genus *Candida*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 33, 1-10.
- Vit, P., E. Enriquez, M. O. Barth, A. H. Matsuda y L. Almeida-Muradian (2006). Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *MedULa*, 15, 89-95.
- Vit, P., M. C. Fernandez-Maeso y A. Ortiz-Valbuena (1998). Potential use of the three frequently occurring sugars in honey to predict stingless bee entomological origin. *Journal of Applied Entomology*, 122, 5-8.
- Vit, P., S. Bogdanov y V. Kilchenmann (1994). Composition of Venezuelan honeys of stingless bees (Apidae: Meliponinae) and *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 25, 278-288.

Capítulo I

Walker, G. M. (1998). *Yeast. Physiology and Biotechnology*. Wiley. Chichester, England.
321 p.

CALIBRACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO POR ABSORBANCIA Y CONTEOS CELULARES EN TRES ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS EN NÉCTAR FLORAL Y MIEL DE *MELIPONA BEECHEII*

INTRODUCCIÓN

Los métodos de referencia para estimar el crecimiento de microorganismos han sido el conteo celular bajo el microscopio y la enumeración de células viables (unidades formadoras de colonia, UFC) en medios sólidos (Becker *et al.*, 1990; Pringle y Mor, 1975). Ambas técnicas se consideran precisas, no obstante, implican mucho tiempo, son destructivas e incluso costosas (Valero *et al.*, 2006; Baty *et al.*, 2002). Una alternativa es la absorbancia o también llamada densidad óptica, la cual es una técnica indirecta desarrollada para contrarrestar estas desventajas (Widdel, 2010; Becker *et al.*, 1990; Pringle y Mor, 1975).

La absorbancia es un método rápido y de amplio uso que expresa la disminución en el paso de la intensidad de luz por las células en suspensión (Pringle y Mor, 1975). La "Ley de Beer" indica que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración celular (densidad celular = células vivas + muertas) y mantienen una relación lineal (Valero *et al.*, 2006). Esto ha propiciado el uso de esta técnica para expresar el crecimiento microbiano en diversas investigaciones, las cuales concluyen que es un enfoque válido y confiable como el conteo celular (Valero *et al.*, 2006; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Domínguez *et al.*, 2001).

No obstante, la relación absorbancia-concentración celular presenta una limitación que es inherente al método, y esto es, que la proporcionalidad entre ambos parámetros sólo existe a bajas concentraciones celulares, las cuales representan valores ≤ 0.4 de absorbancia. Cuando la concentración celular es elevada (> 0.4 absorbancia o aprox. 6×10^6 células mL^{-1}), la agregación celular es alta y ciertas células enmascaran el efecto de otras, provocando que los valores de absorbancia subestimen la concentración real de células (Widdel, 2010; Baty *et al.*, 2002; Pringle y Mor, 1975). Una solución propuesta, es la generación de curvas de calibración, esto es, modelos que expresen la relación entre la concentración celular y la absorbancia. Estas curvas permiten realizar conversiones y predicciones confiables entre estos parámetros, ya que generan una corrección de los

valores hallados fuera del rango de proporcionalidad (Valero *et al.*, 2006; Pringle y Mor, 1975), lo que permite ampliar el rango de medición.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la relación entre los valores de absorbancia y los conteos celulares en tres cepas de levaduras del néctar floral y la miel de *Melipona beecheii*, y luego encontrar el modelo (curva) de calibración más adecuado y preciso que permita estimar la concentración celular a partir de la absorbancia. Estos modelos son importantes ya que se utilizarán más adelante (capítulo II) para estimar el crecimiento de cada una de las cepas de estudio, en experimentos donde únicamente se registrará la absorbancia. Como un ejercicio comparativo y de control se anexo al estudio una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que representa el microorganismo eucarionte más estudiado y el modelo general de análisis del crecimiento de las levaduras, por lo tanto se incluyó como un parámetro de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivación de cepas

Las levaduras *Metschnikowia koreensis*, *Candida cf. apicola* y *Sympodiomyopsis paphiopedili* (Cuadro 1), utilizadas para construir las curvas de calibración, provinieron de la colección de levaduras silvestres CICY-RN a cargo de la Dra. Azucena Canto y Rosalina Rodríguez, y fueron aisladas por Lizama (2011) en el néctar floral y la miel de *Melipona beecheii*. Estas cepas se encontraban en un estado de preservación a 10° C de temperatura en agua destilada y a partir de este material se iniciaron los experimentos de cultivo. Más adelante (capítulo II) se evaluará el crecimiento de las cepas *C. apicola* y *C. cf. apicola*, las cuales muestran una similitud genética (Cuadro 1) y por lo tanto en esta sección sólo se realizará una curva de calibración que se utilizará para ambas cepas. Previo a los experimentos, todas las cepas fueron reactivadas en cajas de Petri con medio sólido GELPA (glucosa 20g L⁻¹, peptona 10g L⁻¹, extracto de levadura 5g L⁻¹ y agar 20g L⁻¹) y fueron incubadas a 30° C durante 5 a 12 días hasta que se observó el crecimiento de las colonias. La cepa de *S. cerevisiae* donada por el Dr. Felipe Barahona (Unidad de Energía Renovable, CICY) se encontraba en crecimiento activo en medio GELPA y al momento de iniciar los experimentos se procedió a su cultivo de manera similar a lo descrito para las otras levaduras.

Curvas de calibración

Para generar las curvas de calibración, el primer paso fue cultivar por triplicado cada una de las cepas en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio líquido GELP (glucosa 20g L⁻¹, peptona 10g L⁻¹ y extracto de levadura 5g L⁻¹). En cada caso, el inóculo utilizado tuvo una densidad de 9×10^7 células vivas mL⁻¹ de medio de cultivo (= 9×10^4 células vivas μL^{-1}) y fue generado de cada cepa reactivada inicialmente en placas con medio sólido GELPA. Los matraces fueron cubiertos con tela Magitel® para permitir la aireación del cultivo y fueron mantenidos en agitación a 150 rpm en un agitador orbital ZHICHENG ZHWY-200B a una temperatura de 30° C, bajo la cual se ha reportado el crecimiento de estas cepas (Barnett *et al.*, 2007; Sugiyama *et al.* 1991).

El crecimiento de cada cepa se estimó por dos métodos de forma simultánea, esto es, que en cada uno de los tres matraces se extrajeron dos muestras, a una se le estimó el número de células por conteo directo en una cámara Neubauer Marinfield® (0.1 mm de profundidad de cámara y 0.0025 mm² de cuadro pequeño) y a la otra se le registró la absorbancia en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV-Vis calibrado a una longitud de onda de 590 nm, la cual es común para estudiar el crecimiento de levaduras (Janssens *et al.*, 1983; Macara, 1978). Para la lectura de absorbancia se utilizó como una solución control el medio GELP estéril (Becker *et al.*, 1990) a fin de acotar la absorbancia debida solo al medio de cultivo y así obtener el valor real de absorbancia debido directamente al crecimiento celular. En cada cepa la estimación del crecimiento por ambos métodos en los matraces, se efectuó cada 6, 8 o 12 horas, a fin de abarcar todas las fases de crecimiento: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. En general, la duración de los experimentos fue de 76 horas para todas las cepas, excepto para *S. cerevisiae* (66 h). El volumen de la muestra analizada extraído de cada matraz fue de cuatro mililitros.

Análisis estadísticos

Curvas de calibración. Para cada cepa, la relación entre la absorbancia (variable dependiente) y el conteo celular (variable independiente), ambos registrados en la misma muestra y a una misma hora, se exploró mediante modelos de regresión. Después de obtener el modelo que mejor se ajustó a ambos parámetros, se efectuó la conversión de los datos de absorbancia a conteos celulares para obtener las curvas de calibración. Para ambos conjuntos de datos se graficó la media y la desviación estándar para visualizar sus

tendencias. Las pruebas estadísticas se efectuaron en el software SPSS versión 17 y el material gráfico se realizó en SigmaPlot ver. 11.

RESULTADOS

Saccharomyces cerevisiae

En *S. cerevisiae*, las curvas de crecimiento por absorbancia y por conteos celulares mostraron una variación similar, no obstante los valores obtenidos por ambos métodos no se asociaron de forma lineal. La relación entre los datos se ajustó mejor a un modelo de regresión cuadrática, el cual fue significativo ($R^2 \text{ Adj.} = 0.965$, $F_{2,37} = 532.917$, $p < 0.0001$). La Figura 2 muestra que cuando los valores de ambos parámetros son elevados, la relación lineal entre ellos desaparece. El modelo de regresión cuadrática inicialmente obtenido presentaba una constante (ordenada al origen) de valor negativo, sin embargo esto carecía de sentido biológico, ya que cuando no existían células en el cultivo el valor de absorbancia debería ser cero y la relación entre estas variables debería pasar por el punto 0,0. Por lo tanto, se forzó a que los modelos de regresión cuadrática pasaran por el origen y esto se logró asignando a la constante el valor de cero. Este mismo procedimiento se efectuó para cada una de las cepas de estudio restantes.

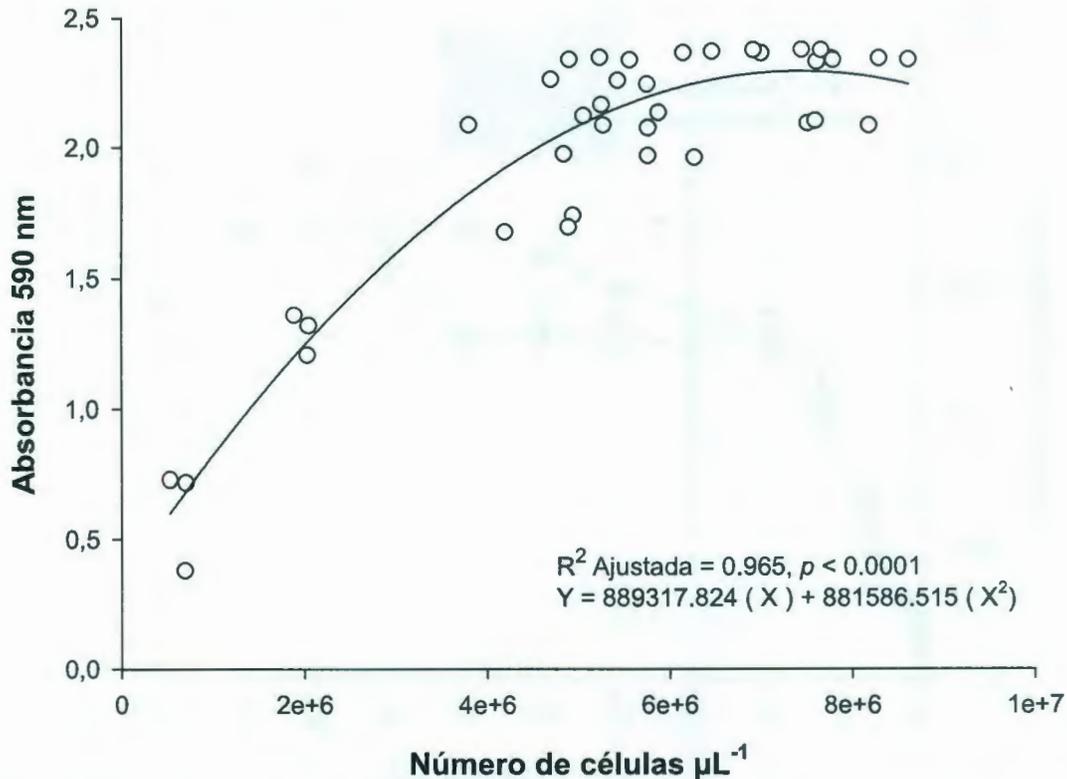


Figura 2. Regresión cuadrática con constante de valor cero entre el número de células de *Saccharomyces cerevisiae* registradas por conteo celular y el estimado por el método óptico de absorbancia durante el crecimiento.

Con la ecuación del modelo de regresión cuadrática se construyeron las curvas de calibración y luego se realizó la conversión de los valores de absorbancia a valores de concentración celular (datos estimados). En la Figura 3 se representan dos curvas de crecimiento de esta especie, una generada a partir del conteo celular directo y la otra a partir de los datos de concentración celular estimados. En ambas curvas se observó que la fase de latencia estuvo ausente, mientras que la fase exponencial inició temprano y la fase estacionaria se prolongó por más tiempo. El mejor traslape entre la curva experimental y la predicha ocurrió en la fase exponencial.

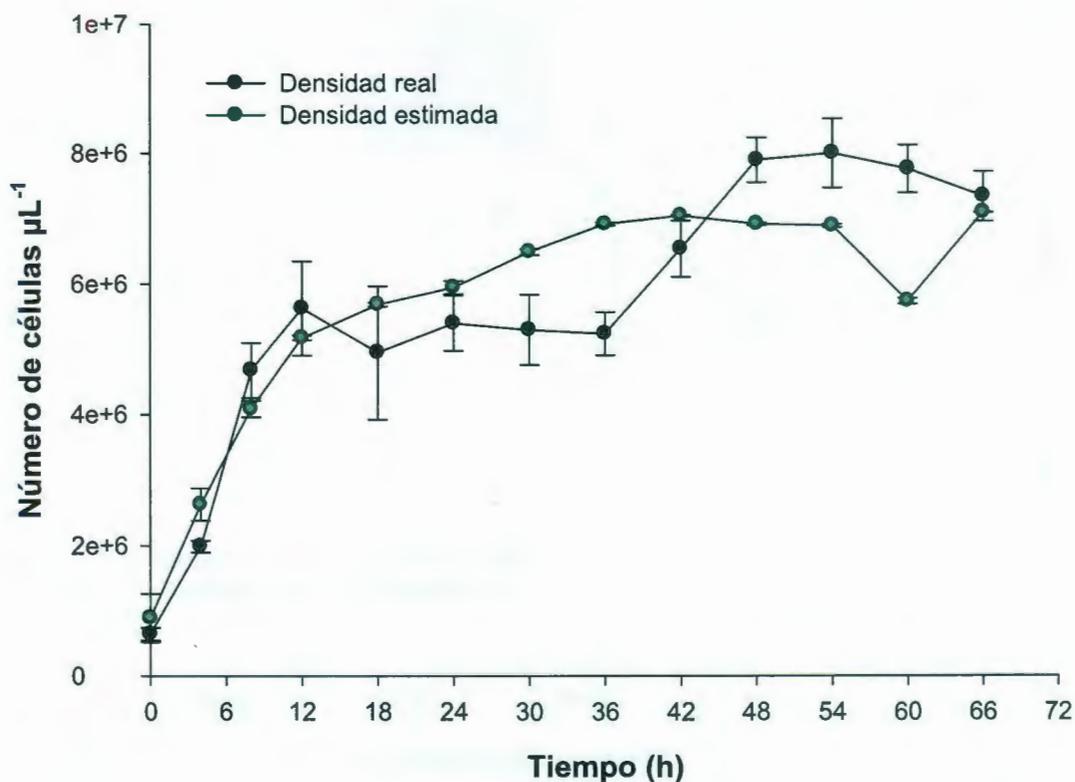


Figura 3. Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.

Metschnikowia koreensis

En esta especie la curva de crecimiento por absorbancia mostró poca similitud a la obtenida por recuentos celulares. La Figura 4 demuestra que no existe una completa asociación lineal entre ambas estimaciones. La mejor relación entre los valores de absorbancia y los conteos celulares se obtuvo mediante un modelo de regresión cuadrática, el cual fue significativo (R^2 Adj. = 0.968, $F_{2, 28} = 458.398$, $p < 0.0001$) y tuvo una bondad de ajuste mayor que la obtenida con *S. cerevisiae*, pero menor que la obtenida con *C. cf. apicola*, como se observará más adelante.

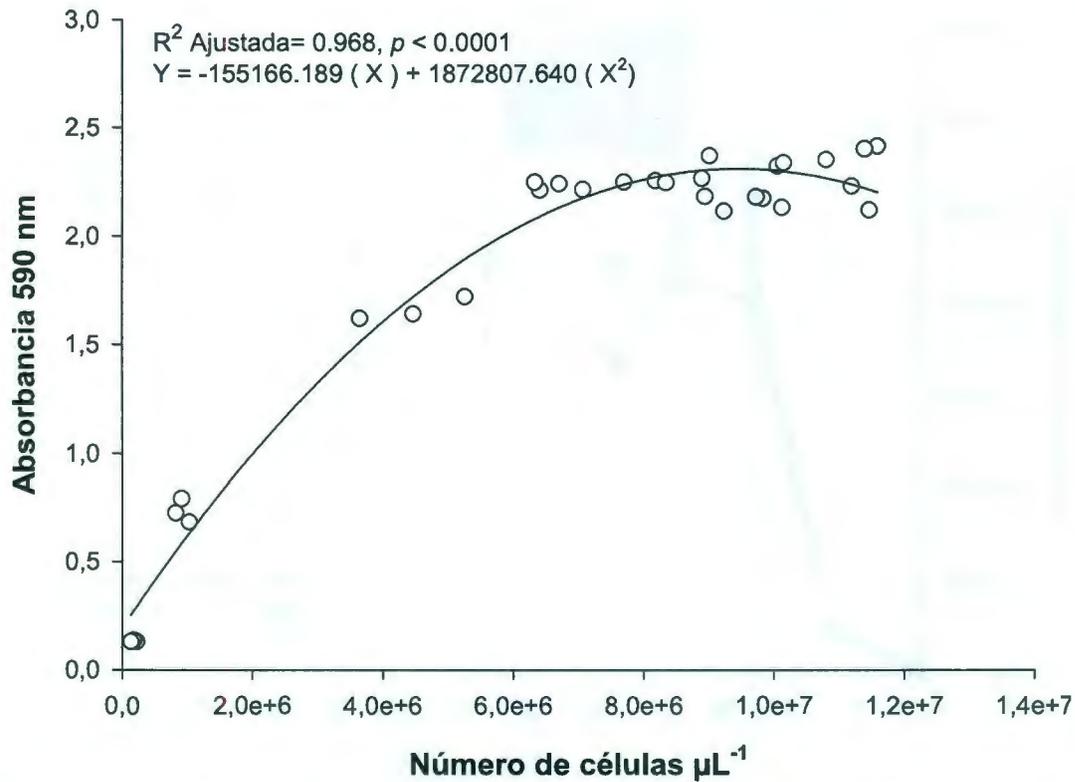


Figura 4. Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de *Metschnikowia koreensis* registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.

La conversión de los datos de absorbancia a valores de concentración celular con base en la curva de calibración, mostró que el crecimiento expresado en número de células estimadas por calibración tuvo poca similitud con el obtenido por el número de células observadas experimentalmente y que la mayor variación estuvo presente en la fase estacionaria. Bajo ambas técnicas, se observó que las etapas del crecimiento se dividieron en una fase de latencia corta, una fase exponencial breve y una fase estacionaria larga (Figura 5).

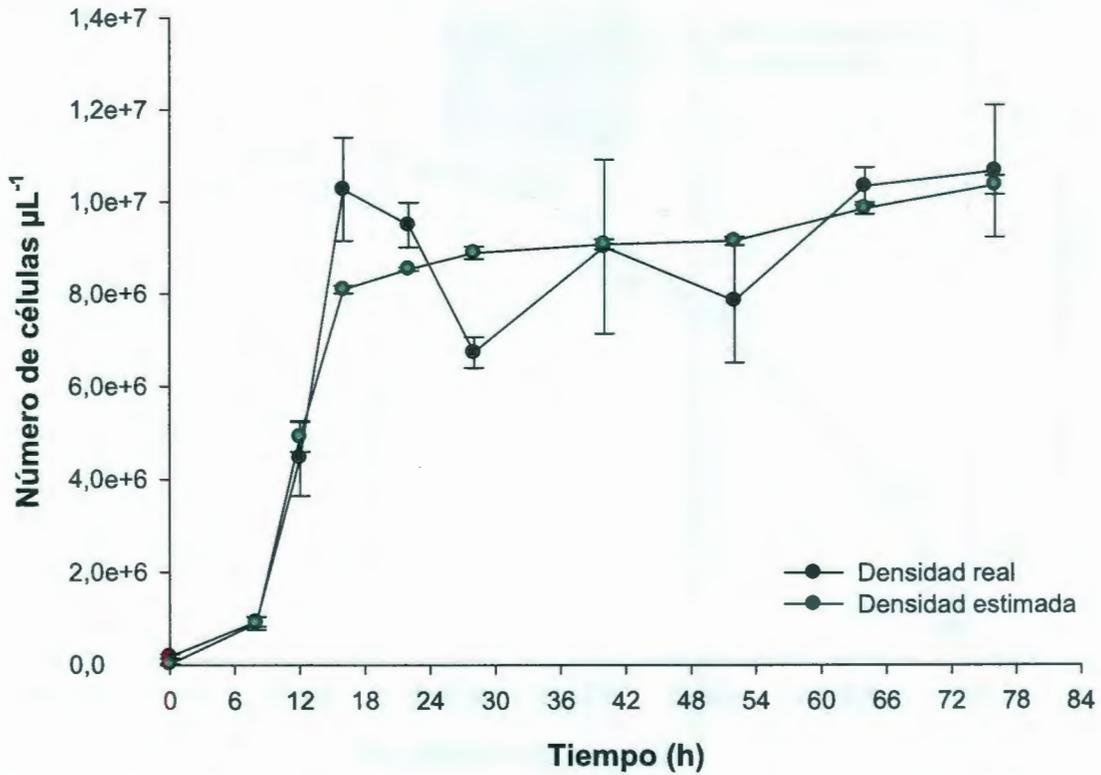


Figura 5. Crecimiento de *Metschnikowia koreensis* expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.

Sympodiomyces paphiopedili

En esta especie, ambos métodos de estimación (absorbancia y conteos celulares) generaron curvas de crecimiento con un comportamiento similar. Sin embargo, al igual que en los casos anteriores, los valores de ambos conjuntos no tuvieron una asociación lineal (Figura 6). El mejor ajuste se obtuvo con un modelo de regresión cuadrática, el cual fue significativo (R^2 Adj. = 0.991, $F_{2, 28} = 1707.657$, $p < 0.0001$) y superior a lo obtenido con *S. cerevisiae* y *M. koreensis*, pero menor que lo obtenido con *C. cf. apicola* como se observará posteriormente.

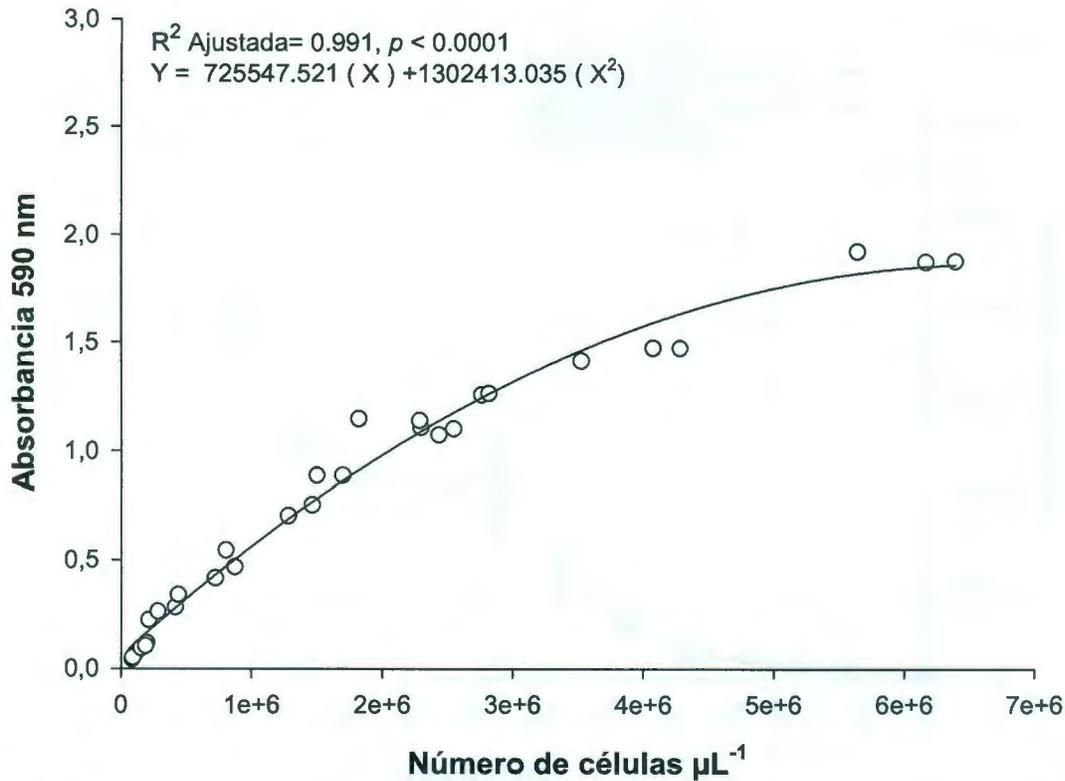


Figura 6. Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de *Sympodiomyopsis paphiopedili* registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.

Al transformar los datos de absorbancia en número de células con ayuda de la curva de calibración, se observó que los valores calculados fueron idénticos con el número de células observadas por conteo al microscopio. En esta especie el crecimiento fue muy lento y sólo se registró la fase de latencia y la fase exponencial, las cuales tuvieron una duración larga (Figura 7).

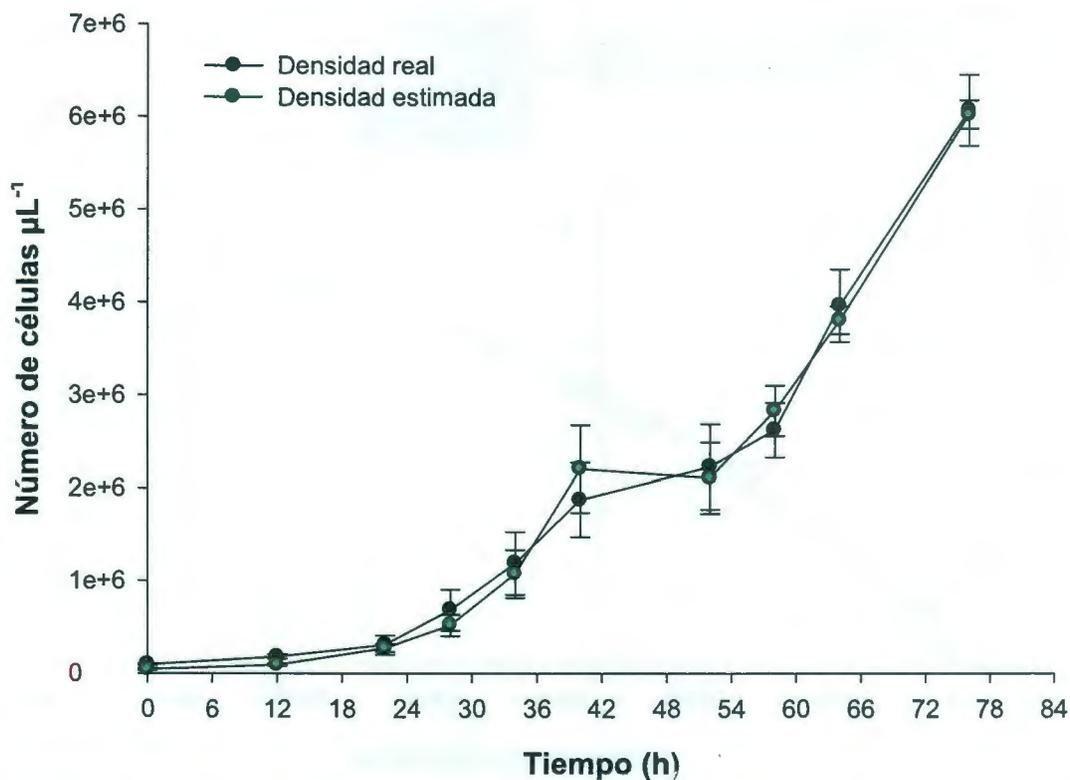


Figura 7. Crecimiento de *Sympodiomyces paphiopedili* expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.

Candida cf. apicola

En esta especie, las curvas de crecimiento por absorbancia y por conteos celulares tuvieron un comportamiento similar, pero la asociación entre ambos datos no fue lineal (Figura 8). Por ello se ajustó un modelo de regresión cuadrática, el cual fue estadísticamente significativo y con una bondad de ajuste muy alta en comparación con lo anteriormente registrado en *S. cerevisiae* (R^2 Adj. = 0.994, $F_{2, 28} = 2299.739$, $p < 0.0001$). El modelo de la regresión aparece en la Figura 8 y en esta se observa que a valores elevados de ambos parámetros la relación lineal entre ellos desaparece, de manera similar a lo registrado en *S. cerevisiae*.

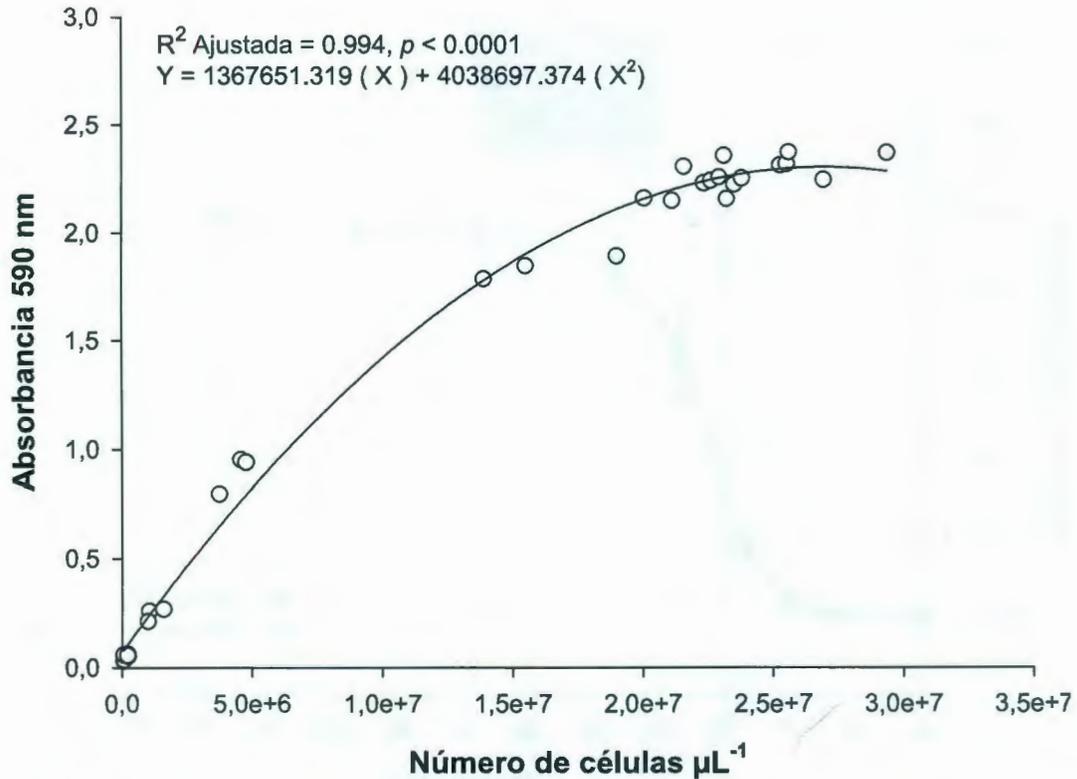


Figura 8. Regresión cuadrática con constante cero entre el número de células de *Candida cf. apicola* registradas por conteo celular y el estimado por lectura de absorbancia durante el crecimiento.

La conversión de los valores de absorbancia a valores de concentración celular mediante las curvas de calibración, mostró que el crecimiento expresado en número de células estimadas por calibración fue casi idéntico al obtenido por el conteo celular directo. Los dos enfoques mostraron que esta especie tuvo una fase de latencia breve, que se refiere al período transcurrido desde el inicio del experimento durante el cual no se registró proliferación celular. Posteriormente se observó una fase exponencial breve y una fase estacionaria prolongada (Figura 9).

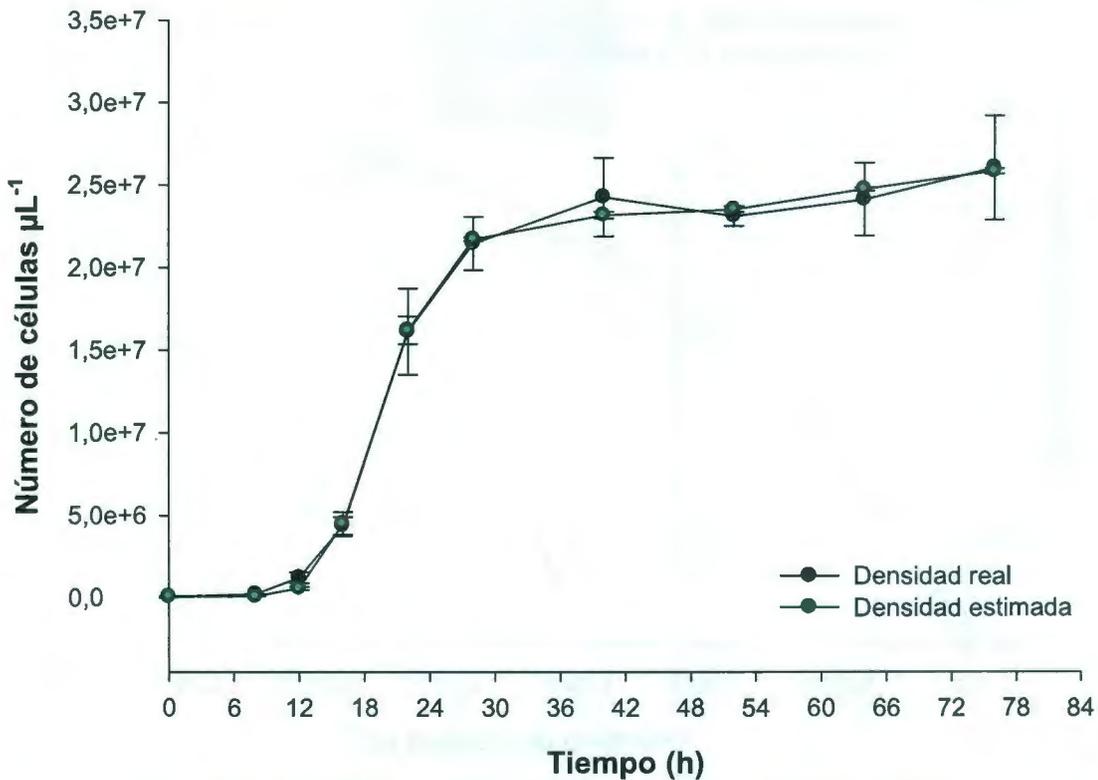


Figura 9. Crecimiento de *Candida cf. apicola* expresado en número de células observadas experimentalmente y en número de células estimadas con base en la curva de calibración. Los resultados mostrados expresan el promedio de tres repeticiones \pm D.E.

DISCUSIÓN

Idealmente, una curva de crecimiento microbiano se construye registrando el número de células vivas en función del tiempo (Peleg y Corradini, 2011). A pesar de esto, la lectura de absorbancia constituye un método de uso común para monitorear dicho crecimiento debido a su rapidez, facilidad y precisión (Valero *et al.*, 2006; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). Sin embargo, es frecuente generar estimaciones erróneas con esta técnica, cuando no se consideran sus limitaciones. El principal inconveniente es que su proporcionalidad con la concentración celular desaparece cuando se exceden valores de 0.4 y esto es porque existe una elevada concentración de células que al superponerse llevan a subestimar la absorbancia real (Pringle y Mor, 1975). Esto ocurrió en las curvas de crecimiento de las cepas en estudio, donde desde las primeras horas se registraron

valores elevados de absorbancia, los cuales carecieron de una relación lineal con el número de células registrado por conteo directo. Este hecho fue generalizado y no significó una respuesta dependiente de la especie. Tzec-Gamboa (2006) también encontró que el valor de absorbancia de 0.4, es rápidamente superado durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida lusitanae*, bajo condiciones similares a las seguidas en este experimento.

Algunos estudios demuestran que las curvas de crecimiento obtenidas por absorbancia y por conteo celular pueden diferir, y por tanto, el crecimiento y los parámetros cinéticos explicados por ambos métodos son distintos (Hudson y Mott, 1994). En este trabajo, las curvas de crecimiento basadas en lecturas de absorbancia, demostraron un patrón de crecimiento similar al obtenido por conteo celular, y en algunos casos la correspondencia fue alta, como sucedió en *C. cf. apicola* y *S. paphiopedili*. En *S. cerevisiae* y *M. koreensis*, las diferencias entre las curvas estimadas por conteo celular y por lectura de absorbancia se registraron en las fases tardías del crecimiento, donde los valores de ambos parámetros fueron altos. Los resultados de esta tesis concuerdan con otros estudios en donde las estimaciones hechas por ambas técnicas fueron similares al evaluar el crecimiento y los parámetros cinéticos (Valero *et al.*, 2006; Horáková *et al.*, 2004; Baty *et al.*, 2002; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Domínguez *et al.*, 2001). Se ha señalado que este método indirecto es un predictor confiable del crecimiento microbiano, aunque puede arrojar ligeras diferencias (Horáková *et al.*, 2004; Baty *et al.*, 2002).

Una sugerencia básica cuando se emplea la absorbancia y en específico cuando sus valores son elevados, es construir curvas de calibración. Estas curvas asocian los valores de absorbancia (inclusive aquellas fuera del rango de proporcionalidad) a la concentración celular (Pringle y Mor, 1975). En todas las cepas de estudio, el crecimiento en número de células estimadas por calibración fue muy similar al obtenido por conteos reales. La exactitud en las predicciones fue alta en *C. cf. apicola* y *S. paphiopedili* seguido de *M. koreensis* y *S. cerevisiae*. Otros autores también señalan que la calibración es un método confiable para corregir las limitaciones de la absorbancia y predecir correctamente el crecimiento celular (Valero *et al.*, 2006; Dalgaard y Koutsoumanis, 2001).

Aún no es claro si los métodos de absorbancia para estimar el crecimiento microbiano son específicos o son extensamente aplicables a diferentes tipos de microorganismos (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). Ante esto, se recomienda el uso de las mismas cepas o especies, o en su caso cepas similares, cuando se decide realizar

curvas de calibrado (Pringle y Mor, 1975). Por ejemplo, las especies en este estudio exhibieron diferencias contrastantes en la morfología y la dimensión celular (ver capítulo III). Difícilmente las curvas de calibrado generadas para una especie podrían ser predictores seguros de la concentración celular en otras especies diferentes. Es por ello que en este trabajo se decidió realizar la calibración para cada cepa estudiada.

Pringle y Mor (1975) señalan que la relación entre la concentración celular y la absorbancia, puede modificarse conforme varía el estado fisiológico de las células y su morfología. Al respecto, Baty *et al.* (2002) encontraron que el incremento en los valores de absorbancia pudo deberse a dos factores: a) un aumento en el volumen de las células en cultivo o b) por refracción. Sugieren que no necesariamente la multiplicación celular detona un incremento, si las células requieren alcanzar un gran tamaño para dividirse esto generará cambios en la absorción y la desviación de la luz que modificarán la lectura de absorbancia y posiblemente lleven a subestimarla. O bien, si la célula necesita acumular sustancias intracelulares antes de multiplicarse, la refracción celular también tendrá influencia, ya que se absorberá más luz. Estos señalamientos hacen necesario incorporar simultáneamente la estimación mediante la lectura de absorbancia y el conteo celular directo cuando se monitorea el crecimiento microbiano (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Pringle y Mor 1975). Por sí sola, la absorbancia puede llevar a conclusiones inexactas sobre los fenómenos y parámetros de interés. Sin embargo, existen reportes de estimaciones precisas basadas únicamente en esta técnica, pero aplicando modelos matemáticos específicos (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001). En esta tesis se obtuvieron buenas estimaciones con la absorbancia, pero las calibraciones generaron resultados más exactos en las curvas de crecimiento de las especies de levaduras estudiadas.

Recomendaciones

Una alternativa que se sugiere para reducir errores en las estimaciones y en los valores que se registran fuera del rango de proporcionalidad entre la absorbancia y los conteos celulares, consiste en realizar diluciones de las muestras cuando estas superan el valor límite de absorbancia que es de 0.4 (Pringle y Mor, 1975). Esto es, si al realizar la lectura en el espectrofotómetro se obtiene un valor de 1.0, entonces se realiza una dilución de la muestra para obtener un valor menor que mantenga la relación proporcional con la concentración celular. Por ejemplo, considerando la lectura anterior, se debe tomar un

mililitro de la muestra y adicionar cuatro mililitros del mismo medio de cultivo estéril (dilución 1:4), de manera que al realizar nuevamente la lectura teóricamente se obtendrá un valor de 0.25. Finalmente, para obtener la concentración original de células sólo se multiplica por el factor de dilución empleado, que en el ejemplo anterior fue cuatro. Idealmente, se sugiere realizar las diluciones con el mismo medio líquido utilizado en el cultivo y además realizar las pruebas por triplicado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow (2007). *Yeasts: Characteristic and Identification*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kindom. 1139 p.
- Baty, F., J. P. Flandrois y M. L. Delignette-Muller (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5816-5825.
- Becker, J. M., G. A. Caldwell y E. A. Zachgo (1990). *Biotechnology: a Laboratory Course*. Academic Press Inc. San Diego California, USA. 232 p.
- Dalgaard, P. y K. Koutsoumanis (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 183-196.
- Domínguez, M. C., M. de la Rosa y M. V. Borobio (2001). Application of a spectrophotometric method for the determination of post-antibiotic effect and comparison with viable counts in agar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 391-398.
- Horáková, K., M. Greifová, Z. Seemannová, B. Gondová y G. M. Wyatt (2004). A comparison of the traditional method of counting viable cells and a quick microplate method for monitoring the growth characteristics of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 181-184.
- Hudson, J. A. y S. J. Mott (1994). Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Safety*, 14, 329-339.
- Janssens, J. H., N. Burris, A. Woodward y R. B. Bailey (1983). Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 598-602.

- Lizama, B. (2011). Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 77 p.
- Macara, I. G. (1978). Accommodation of yeast to toxic levels of cadmium ions. *Journal of General Microbiology*, 104, 321-324.
- Peleg, M. y M. G. Corradini (2011). Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 917-945.
- Pringle, J. R. y J. R. Mor (1975). Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem, en: *Methods in Cell Biology*. Volume XI Yeast Cells, D. M. Prescott (ed.). Academic Press. New York, USA. pp. 131-168.
- Sugiyama, J., K. Tokuoka, S. Suh, A. Hirata y K. Komagata (1991). *Sympodiomyces*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 95-108.
- Tzec-Gamboa, M. (2006). Evaluación de levaduras aisladas de mostos de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) para la producción de una bebida alcohólica. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 80 p.
- Valero A., F. Pérez-Rodríguez, E. Carrasco, R. M. García-Gimeno y G. Zurera (2006). Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. *Journal of Food Science*, 71, 257-264.
- Widdel, F. (2010). Theory and measurement of bacterial growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4, 1-11.

CURVAS DE CRECIMIENTO Y MORFOLOGÍA CELULAR DE LEVADURAS DEL NÉCTAR DE PLANTAS MELÍFERAS Y DE LA MIEL DE *MELIPONA BEECHEII*, ANTE UN GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

INTRODUCCIÓN

El conocimiento sobre levaduras asociadas al néctar floral y a la miel, inició con estudios centrados en conocer las especies presentes (Segui-Crespo *et al.*, 1991; Sandhu y Waraich, 1985; Marvin *et al.*, 1931) y con menor frecuencia figuraron trabajos de contenido ecológico. En años recientes, se ha generado información novedosa que permite abordar cuestionamientos aún no resueltos, tales como el efecto que tienen las levaduras sobre el néctar floral, la miel y las abejas (Herrera *et al.*, 2012; Canto *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2008).

Actualmente, se sabe que estos hongos unicelulares están presentes a lo largo de la cadena de transformación del néctar a miel, incluyendo su presencia en el néctar floral (Herrera *et al.*, 2009), en el cuerpo de las abejas (tracto digestivo) y en los reservorios de alimentos (miel y polen) así como en el alimento larval (Lizama, 2011; Rosa *et al.*, 2003). Por tanto, también enfrentan un incremento gradual de la concentración de azúcares y una reducción en el contenido de agua, inherentes a esta cadena de transformación físico-química (Park, 1925). Las condiciones en la miel son difíciles para la vida microscópica debido a la alta concentración de solutos y a la poca agua disponible en el medio, y sólo prevalecen microorganismos que soporten las elevadas presiones osmóticas, los denominados “osmofílicos” u “osmotolerantes” (Tokuoka, 1993).

Se ha sugerido que los microorganismos asociados a las abejas posiblemente mantengan una relación simbiótica que favorece la nutrición de estos insectos (Gilliam, 1997). Sin embargo, el conocimiento sobre los requerimientos y necesidades de esta microbiota aún es escaso (Anderson *et al.*, 2011). Al respecto, Rosa *et al.* (2003) mencionan que el efecto de las levaduras sobre los alimentos ricos en azúcares hallados en la colmena es un tema que requiere analizarse para poder esclarecer su función ecológica.

En la actualidad, no existe información sobre las características que presentan las levaduras observadas a lo largo de la transformación de néctar en miel, en donde el incremento en la concentración de los azúcares actúa como una forma de presión

selectiva sobre estos microorganismos asociados. Por ello, el objetivo del presente capítulo fue estudiar el efecto que ejerce el incremento en la concentración de glucosa sobre el crecimiento y la morfología en dos cepas procedentes de la miel de *M. beecheii* y en dos cepas del néctar de plantas melíferas, a fin de identificar respuestas que permitan explicar su presencia en los sitios de su aislamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de especies de estudio

Del conjunto de levaduras aisladas por Lizama en el 2011, en el néctar floral y la miel, únicamente se seleccionaron cepas procedentes del néctar de plantas melíferas importantes para la actividad apícola. Asimismo, las cepas de la miel de *M. beecheii* se consideraron de interés en este trabajo, debido a que esta abeja sin aguijón es nativa de la región, y posiblemente ha tenido contacto con la flora melífera por largo tiempo, así como sus microorganismos asociados. Es probable que estos tres elementos: flora, abejas y microbiota, mantengan una relación con historia evolutiva, que resulta un buen modelo para estudiar el papel de la microbiota en la alimentación de las abejas. El cuadro 1 enlista las cepas y especies de estudio, así como algunos datos sobre su identificación por secuenciación genética. *Candida* cf. *apicola* correspondió a una cepa con una identidad genética muy similar a *C. apicola*. El género *Metschnikowia* es de interés debido a reportes previos de su asociación con abejas (Brysch-Herzberg, 2004).

Cuadro 1. Relación de las levaduras en este estudio y los sitios de su aislamiento. Se incluyen además, datos sobre su identificación por secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal 26S del ADN y la posterior consulta en el GenBank con el programa BLAST.

Cepa / especie	División	Sitio de aislamiento	% Query. coverage ^a	% Max. Identity ^b
<i>Metschnikowia koreensis</i>	Ascomycetes	Néctar de <i>Tecoma stans</i>	37	98
<i>Symptodiomyces paphiopedili</i>	Basidiomycetes	Néctar de <i>Merremia aegyptia</i>	100	99
<i>Candida apicola</i>	Ascomycetes	Ánfora llena de miel (madura) de <i>M. beecheii</i>	54	98
<i>Candida</i> cf. <i>apicola</i>	Ascomycetes	Ánfora semi-llena de miel (inmadura) de <i>M. beecheii</i>	99	100

^aQuery coverage = porcentaje de la secuencia de consulta que coincide (en longitud) con la secuencia de estudio (o problema).

^bMax. Identity = porcentaje de similitud (en pares de bases) entre la secuencia de consulta y la de estudio respecto a la longitud del área de coincidencia.

Morfología macroscópica de levaduras

Las cepas de estudio representaban nuevos registros de aislamiento en el néctar floral y en la miel de abejas sin aguijón, y por este motivo resultó importante generar información sobre sus rasgos macroscópicos. Para ello, las cepas que se encontraban en almacenamiento (10° C en agua destilada), se cultivaron en placas con medio sólido GELPA (glucosa 20g L⁻¹, peptona 10g L⁻¹, extracto de levadura 5g L⁻¹ y agar 20g L⁻¹) y se incubaron a una temperatura de 30° C en la cual se ha reportado el crecimiento de estas cepas (Barnett *et al.*, 2007; Sugiyama *et al.* 1991). Las características registradas cuando las colonias alcanzaron un gran tamaño (6-7 días) fueron la forma, el color, la textura, la elevación sobre el medio y el margen de la colonia (Yarrow, 1998).

Curvas de crecimiento y morfología celular de levaduras

La respuesta de las cepas al incremento en la concentración de glucosa se evaluó mediante experimentos de cultivo en el medio líquido GELP (glucosa 20g L⁻¹, peptona 10g L⁻¹ y extracto de levadura 5g L⁻¹), el cual se elaboró con diferentes cantidades de glucosa. Los tratamientos evaluados fueron: GELP con 2 %, 10 %, 20 %, 40 %, y 60 % de glucosa; la concentración de 2 % sirvió de referencia para comparar el efecto del incremento. Cada tratamiento se realizó por triplicado para cada cepa en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio líquido, que se inocularon en cada caso con una suspensión de 9×10^7 células vivas mL⁻¹ de medio de cultivo ($= 9 \times 10^4$ células vivas μL^{-1}). Los matraces se cubrieron con tela Magitel® para permitir la aireación del cultivo y se colocaron en agitación en un equipo ZHICHENG ZHWY-200B a 150 rpm y 30° C, para mantener disuelto el oxígeno (Becker *et al.*, 1990). Como control, se dejó un matraz con medio líquido de cada tratamiento que fue incubado en las mismas condiciones que los demás matraces, pero a éste no se le inoculó cepa alguna.

En un primer paso, el crecimiento de las cepas se determinó por lectura de absorbancia en un espectrofotómetro JENWAY 6405 UV-Vis calibrado a una longitud de onda de 590 nm y tomando como control el medio de cultivo correspondiente al tratamiento evaluado, pero sin inocular. Este control sirvió para conocer el valor de absorbancia debido solo al medio de cultivo. En cada caso, el volumen tomado de cada matraz y medido en el equipo espectrofotómetro fue de cuatro mililitros. La toma de muestras y su medición respectiva se realizó cada cuatro horas durante las primeras 16 h y luego cada seis horas hasta completar 76 h de crecimiento para cada cepa. Posteriormente, para obtener el crecimiento de cada cepa en términos de la densidad celular, los valores de absorbancia fueron transformados a valores de densidad celulares utilizando la ecuación cuadrática obtenida de las curvas de calibración en el capítulo II. Como *C. apicola* y *C. cf. apicola* fueron cepas con similitud genética y de morfología y tamaño celular similar, se utilizó para ambas una misma curva de calibración.

Una vez obtenidos los valores de densidad celular para cada cepa y de cada tratamiento establecido, se seleccionaron los datos correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de todos los casos y con ellos se calcularon dos parámetros cinéticos: a) la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) (Quintero-Ramírez,

1981), que es la velocidad máxima de multiplicación que alcanza un microorganismo, calculada como:

$$\mu_{\max} = \ln (X_f/X_i) (1/t)$$

Donde:

X_f = Crecimiento final

X_i = Crecimiento inicial

t = Tiempo

ln = logaritmo natural

El segundo parámetro estimado fue b) el tiempo de duplicación, que es el tiempo necesario para que se duplique el tamaño poblacional. Este período es constante durante la fase exponencial y se obtuvo con la ecuación:

$$t_d = \ln 2 / \mu_{\max}$$

Por último, al inicio de la fase estacionaria, se realizaron mediciones morfológicas de las células de cada una de las cepas en los cinco tratamientos evaluados. Para esto, se tomó una alícuota (10 µL) de cada muestra a la que se le agregó azul de lactofenol (10 µL) para teñir las células y después se observó al microscopio a 1000X de magnificación. La caracterización de la morfología incluyó rasgos reportados en la literatura y sugeridos por Yarrow (1998), esto se logró con fotografías microscópicas de una cámara INFINITY 1 y el software INFINITY ANALYZE RELEASE 5.0.2 LUMENERA CORPORATION. Las características registradas fueron la forma, la longitud, el diámetro, el arreglo celular, y la presencia y tipo de filamentos. Para obtener las dimensiones celulares se utilizó un micrómetro digital y se midieron 30 células en los tres matraces de cada tratamiento.

Análisis estadísticos

Curvas de crecimiento. Para determinar el efecto de los diversos factores sobre el crecimiento (variable dependiente) de cada cepa, se realizó una estimación de los componentes de varianza mediante un análisis (multivariado) de modelos mixtos con el método de máxima verosimilitud restringida (REML, por sus siglas en inglés). El modelo incluyó como efectos fijos: la concentración de glucosa, la cepa, las horas (tiempo) y la interacción entre las variables, y además como efecto aleatorio: las réplicas por

tratamiento. Esto se realizó únicamente con los datos de la fase de crecimiento exponencial (que en *S. paphiopedili* se transformaron a la raíz cuadrada) y sin considerar las fases de latencia y la estacionaria debido a que no aportaron variación. Finalmente, este mismo procedimiento se llevó a cabo considerando a la vez todas las cepas de estudio y todas las fases de crecimiento observadas. Estos análisis se realizaron con el procedimiento MIXED en el software estadístico SAS (Statistical Analysis System ver. 9.1.3. Institute, Cary, NC, USA).

Dimensión celular. Por otra parte, el efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre el tamaño celular de cada cepa, se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a la distribución no normal de los datos, esto se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 17.

RESULTADOS

Morfología de las colonias

Levaduras del néctar

Metschnikowia koreensis formó colonias blancas, de circulares a redondeadas, de textura lisa y con el margen entero. Un rasgo particular de esta cepa fueron sus colonias planas y más pequeñas que *C. apicola* (Figura 10). *Sympodiomyces paphiopedili* formó colonias de color crema, con una morfología redondeada a irregular, de márgenes enteros, textura lisa, mucosas, opacas y de elevación convexa (Figura 10).

Levaduras de la miel

Las cepas de *Candida apicola* y *C. cf. apicola* formaron colonias de color blanco, de forma más o menos redondeada hasta circulares, margen entero, textura lisa y brillante, con una pequeña elevación en la parte central de cada colonia a manera de cúpula (Figura 10).

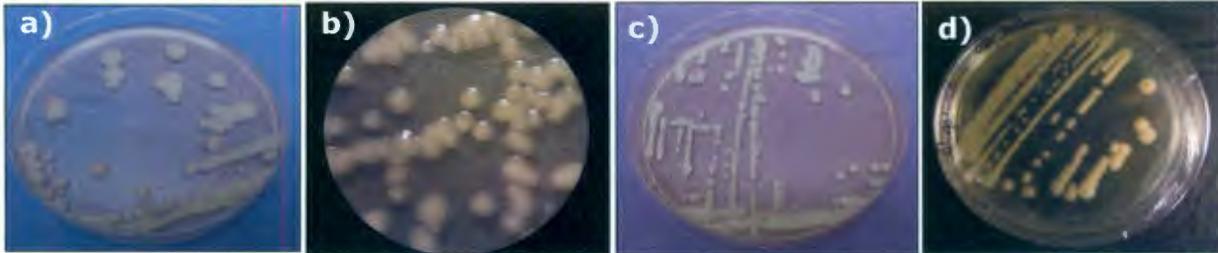


Figura 10. Características de colonias en cultivo GELPA de a) *Metschnikowia koreensis*, b) *Sympodiomyopsis paphiopedili*, c) *Candida cf. apicola* y d) *Candida apicola*. Estas levaduras se aislaron en el néctar de plantas melíferas y en la miel de *M. beecheii*.

Curvas de crecimiento

Metschnikowia koreensis

El modelo bajo el cual se analizaron los componentes de la varianza resultó significativo ($X^2 = 5.20$, g. l. = 1, $p < 0.05$) y la variación inherente a las réplicas no resultó significativa (12 %, $Z = 0.82$, $p = 0.4115$;). Se observó que la concentración de glucosa ($F_{4, 8} = 6181.68$, $p < 0.0001$), las horas ($F_{6, 12} = 2877.74$, $p < 0.0001$) y la interacción concentración*horas ($F_{24, 48} = 112.67$, $p < 0.0001$), afectaron el crecimiento de esta cepa. Los resultados indicaron que el crecimiento de esta cepa fue estadísticamente diferente entre las distintas concentraciones de glucosa evaluadas ($p < 0.0001$, Ajuste Bonferroni), donde el crecimiento más limitado se observó en 60 % de glucosa y los mayores crecimientos ocurrieron en 10 % y 20 %.

El crecimiento de esta cepa en los diferentes tratamientos presentó una fase de latencia, la cual fue de corta duración (8 h) en las concentraciones de 2 %, 10 % y 20 % de glucosa, y duro más tiempo con 40 % (16 h) y 60 % (28 h). La fase exponencial de crecimiento observada tuvo una duración de 14 h en 2 % y 20 %, 20 h en 10 % y en los dos últimos tratamientos (40 % y 60 %) abarcó 18 h. En las concentraciones de 2 %, 10 % y 20 % el crecimiento fue similar y casi duplicó el que se obtuvo en 60 % (Figura 11). Esta cepa creció más rápido en las primeras tres concentraciones a diferencia de *C. apicola* y *C. cf. apicola*, pero el número de células producidas fue muy bajo, como se observará más adelante.

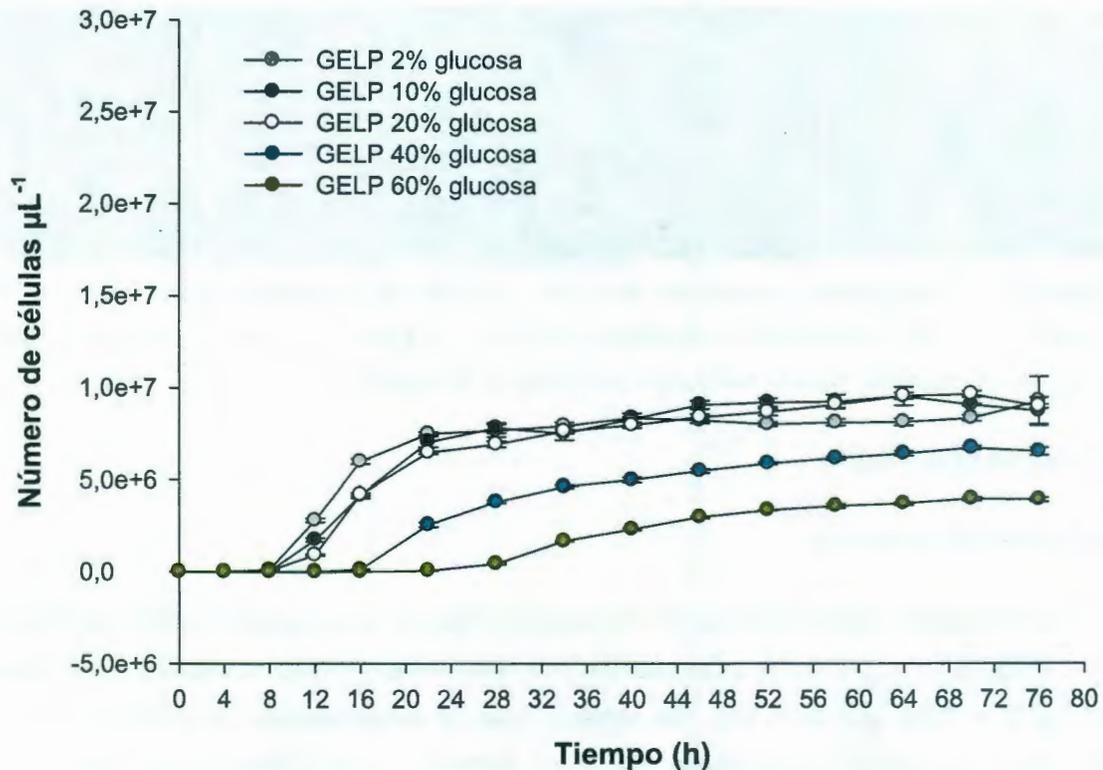


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Metschnikowia koreensis* en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.

Respecto a los parámetros cinéticos, en esta cepa se observó una mayor velocidad de crecimiento y un menor tiempo de duplicación en las concentraciones de 2 %, 10 % y 20 % de glucosa. La condición más negativa fue la concentración de 60 %, en donde el crecimiento fue muy lento y se observó una menor concentración celular (Cuadro 2).

Cuadro 2. Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}), tiempo de duplicación (td) y duración de la fase exponencial (t) en horas, de levaduras aisladas de néctar floral y de miel, ante un gradiente de concentración de glucosa.

Tratamiento/ glucosa	<i>M. koreensis</i> *			<i>S. paphiopedili</i> *			<i>C. apicola</i> **			<i>C. cf. apicola</i> **		
	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)	t	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)	t	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)	t	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)	t
GELP 2%	0.313	2.22	14	0.077	8.98	42	0.190	3.65	22	0.214	3.23	20
GELP 10%	0.292	2.37	20	0.073	9.44	42	0.266	2.61	16	0.243	2.84	18
GELP 20%	0.328	2.11	14	0.074	9.44	42	0.272	2.54	16	0.256	2.70	18
GELP 40%	0.201	3.44	18	0.083	8.3	24	0.256	2.71	18	0.193	3.62	12
GELP 60%	0.106	6.54	18	0.088	7.8	12	0.135	5.12	12	0.166	4.18	12

*. Procedentes de néctar floral; **. Procedentes de miel

Sympodiomyopsis paphiopedili

El modelo de estimación de los componentes de varianza del crecimiento fue significativo ($X^2 = 4.37$, g. l. = 1, $p < 0.05$) pero la variación asociada al efecto de la réplica no fue significativa (9 %, $Z = 0.80$, $p = 0.4246$). Se observó que la concentración de glucosa ($F_{4, 8} = 4789.81$, $p < 0.0001$), las horas ($F_{7, 14} = 4001.04$, $p < 0.0001$) y la interacción concentración*horas ($F_{28, 56} = 101.25$, $p < 0.0001$), también tuvieron un efecto significativo en la forma de crecimiento de esta cepa. Al realizar la comparación del crecimiento entre las concentraciones de glucosa se encontró que todas fueron diferentes entre sí ($p < 0.0001$, Ajuste Bonferroni), a excepción de 2 % y 10 % en donde no se observaron diferencias significativas ($t = -1.57$, g. l. = 8, $p = 1.0$). Tomando como referencia la concentración de 2 %, se observó mayor crecimiento a 10 % que en 40 % ($t = -72.71$, g. l. = 8, $p < 0.0001$) ó 60 % ($t = 109.51$, g. l. = 8, $p < 0.0001$).

La cepa de *S. paphiopedili* tuvo un crecimiento muy diferente respecto a las demás, ya que en todos los tratamientos su fase de latencia excedió los tiempos observados en las otras cepas y en ninguna de las primeras dos concentraciones se observó la fase estacionaria. La fase de latencia duro 34 h en presencia de 2 %, 10 % y 20 % de glucosa, se mantuvo por 40 h en 40 % y se extendió hasta 46 h en 60 %. En las tres primeras concentraciones la fase exponencial permaneció hasta finalizar el tiempo de experimentación y duró 42 h. En 40 % de glucosa esta fase abarcó 24 h y en 60 % duró

12 h, aunque en esta última concentración prácticamente no se observó. Bajo las concentraciones de 2 %, 10 % y 20 %, el crecimiento fue mucho mayor a lo observado en 40 % y 60 %, siendo este último tratamiento el más limitante del crecimiento (Figura 12).

Los parámetros cinéticos resultaron muy distintos a los estimados en las cepas anteriores. Los tratamientos en donde se observó una mayor velocidad de crecimiento y un menor tiempo de duplicación fueron las concentraciones de 40 % y 60 % de glucosa (Cuadro 2), sin embargo, en ambas el número de células producidas fue muy bajo.

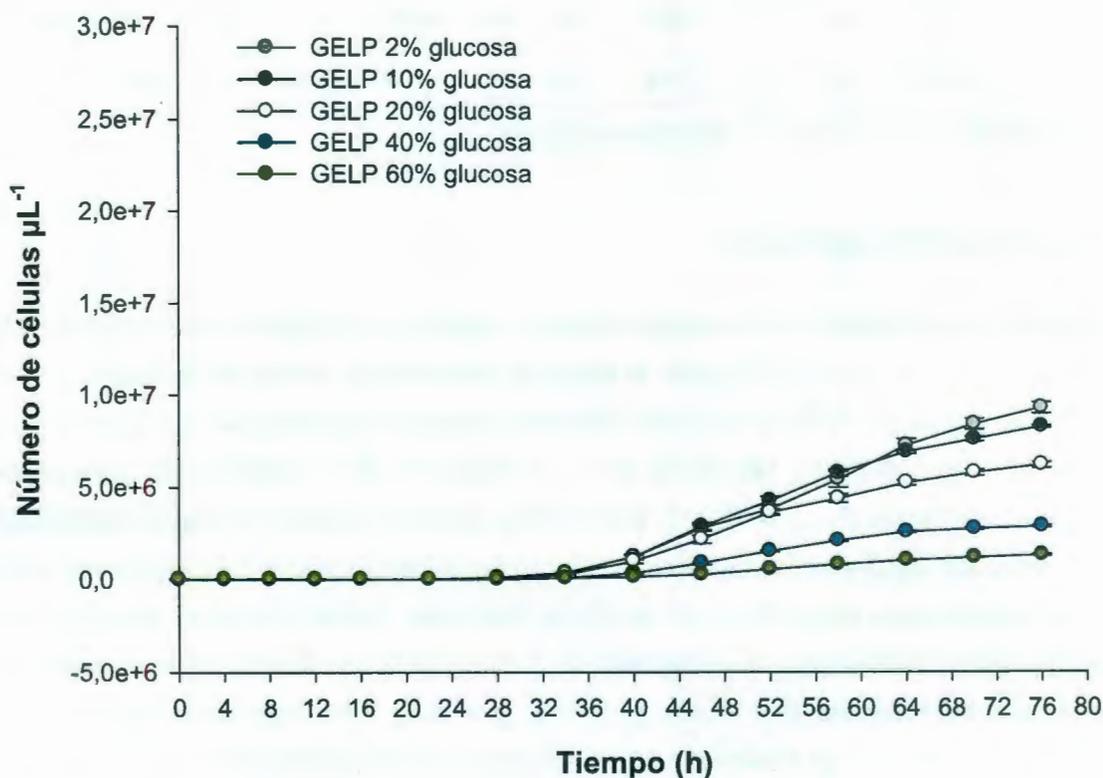


Figura 12. Cinética de crecimiento de *Sympodiomyces paphiopedili* en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.

Candida apicola

El modelo bajo el cual se analizaron los componentes de varianza del crecimiento fue significativo ($X^2 = 7.85$, g. l. = 1, $p < 0.05$) y no se detectó un efecto significativo debido a las réplicas (18 %, $Z = 0.87$, $p = 0.3855$). Se observó que la concentración de glucosa (F_4 ,

$s = 11396$, $p < 0.0001$), las horas ($F_{5, 10} = 11250.1$, $p < 0.0001$) y la interacción concentración*horas ($F_{20, 40} = 482.37$, $p < 0.0001$), tuvieron un efecto sobre el crecimiento de esta cepa. Esto sugirió que la forma de crecimiento dependió de la cantidad de glucosa presente en el medio, que fue diferente a lo largo del tiempo, y que además, las estimaciones realizadas a una hora y concentración específicas fueron distintas de las restantes. La comparación de las curvas de crecimiento entre las concentraciones de glucosa evaluadas indicó que todas fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.0001$, Ajuste Bonferroni). El mayor crecimiento de esta cepa fue en la concentración de 2 % de glucosa, seguido de la de 10 %, y el menor crecimiento se registró con 60 %.

En cada tratamiento se observó una fase de latencia, la cual tuvo una breve duración (12 h) en las concentraciones con 2 %, 10 % y 20 % de glucosa, y que se prolongó durante 16 y 22 h en 40 % y 60 %, respectivamente. La fase de crecimiento exponencial observada tuvo una duración de 22 h en 2 % de glucosa, en 10 % y 20 % duró 16 h y en 40 % y 60 % fue de 18 y 12 h, respectivamente. Además, en estas dos últimas concentraciones se registró el inicio más lento de esta fase. Los datos mostraron que los tres primeros tratamientos casi duplicaron el crecimiento generado en las concentraciones de 40 % y 60 % de glucosa, en donde se experimentó una reducción del crecimiento celular (Figura 13).

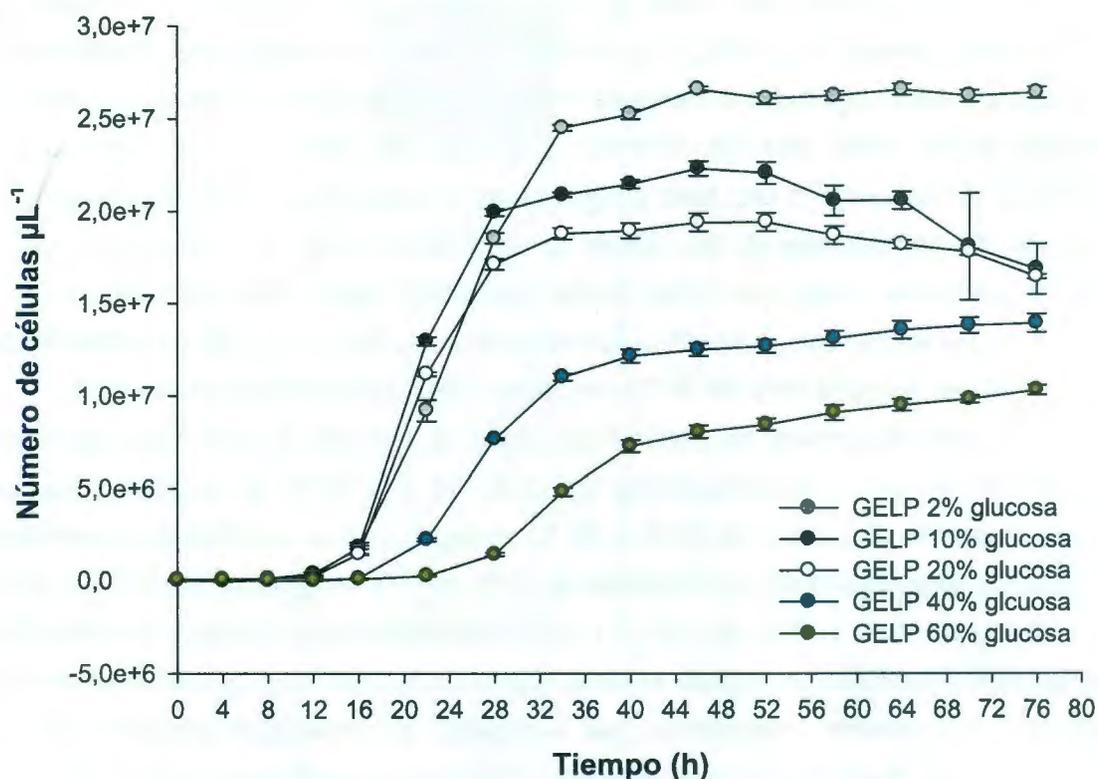


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Candida apicola* en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.

En relación a los parámetros cinéticos, los tratamientos en donde se observó una mayor velocidad de crecimiento y menores tiempos de duplicación, fueron las concentraciones intermedias de glucosa (10 % y 20 %), destacando el tratamiento con 20 % de concentración por presentar la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación. Los tratamientos restantes tuvieron un lento crecimiento y tiempos de duplicación más prolongados (Cuadro 2).

Candida cf. apicola

En *C. cf. apicola* el modelo de análisis de los componentes de varianza fue significativo ($X^2 = 5.88$, g. l. = 1, $p < 0.05$) y la variabilidad debido a las réplicas fue mínima pero significativa (3 %, $Z = -6.27$, $p < 0.0001$). Los resultados indicaron que la concentración de glucosa sí ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento ($F_{4,8} = 177.98$, $p < 0.0001$).

El crecimiento entre cada una de las concentraciones de glucosa evaluadas fue estadísticamente diferente ($p < 0.0001$, Ajuste Bonferroni), a excepción de 2 % y 10 %, en donde no se observaron diferencias ($t = -1.89$, g. l. = 8, $p = 0.9541$). Basándose en la concentración de 2 %, el crecimiento resultó mucho mayor en 10 % de glucosa que en 40 % ($t = -13.06$, g. l. = 8, $p < 0.0001$) y 60 % ($t = 20.70$, g. l. = 8, $p < 0.0001$).

Se observó que la fase de latencia fue cada vez mayor, conforme se incrementó la cantidad de glucosa y lo inverso ocurrió con la fase exponencial. El período de latencia fue breve en 2 % de glucosa (8 h), en 10 % y 20 % duró 16 h, en 40 % fue de 22 h y en 60 % se prolongó 28 h. Evidentemente la fase exponencial inició temprano en 2 % y permaneció por 20 h, mientras que a 10 % y 20 % duró 18 h, y en 40 % y 60 % su duración fue menor, con 12 h. Nuevamente se observó que las dos últimas concentraciones de glucosa (40 % y 60%) afectaron negativamente la multiplicación celular y ocasionaron un retraso en la velocidad de crecimiento (Figura 14).

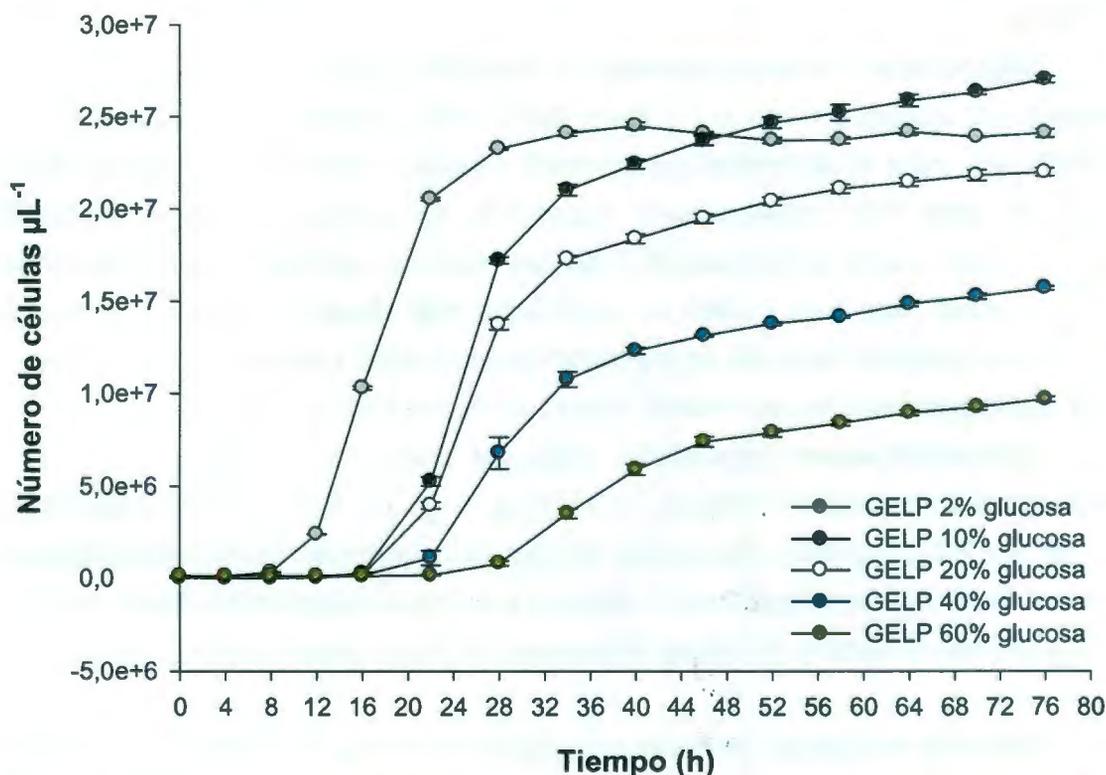


Figura 14. Cinética de crecimiento de *Candida cf. apicola* en medio GELP con incrementos en la concentración de glucosa. Los resultados mostrados son el promedio de tres repeticiones \pm D.E. del número de células.

Las concentraciones con 10 % y 20 % glucosa resultaron menos limitantes del crecimiento en *C. cf. apicola* debido a que condujeron a una mayor velocidad de multiplicación y a un menor tiempo de duplicación en comparación con lo observado en los tratamientos restantes (2 %, 40 % y 60 %). A diferencia de *C. apicola*, esta cepa tuvo un crecimiento más rápido en la concentración con 2 % de glucosa (Cuadro 2).

Comparación entre cepas

El modelo propuesto para analizar los componentes de varianza del crecimiento considerando todas las cepas de estudio e incluyendo todas las fases del crecimiento tuvo un buen ajuste y fue significativo ($X^2 = 40.379$, g. l. = 1, $p < 0.0001$), además de que la varianza debida a la réplica, aunque fue mínima también fue significativa (1 %, $Z = -20.91$, $p < 0.0001$). Se observó en general que el crecimiento dependió de la concentración de glucosa ($F_{9, 39} = 19.10$, $p < 0.0001$) y de la cepa de levadura en cuestión ($F_{3, 8} = 32667.8$, $p < 0.0001$).

Metschnikowia koreensis obtenida del néctar floral mostró una respuesta diferente respecto a *C. apicola* ($t = 8.46$, g. l. = 8, $p = 0.0002$) y *C. cf. apicola* ($t = 24.28$, g. l. = 8, $p < 0.0001$), esta cepa se caracterizó por un rápido crecimiento y una respuesta muy similar en las primeras tres concentraciones (Cuadro 2). En general, el número de células producidas fue mucho menor respecto a las dos cepas de *Candida*. En comparación con *S. paphiopedili*, esta cepa mostró un crecimiento más rápido y un mayor número de células producidas en todas las concentraciones de glucosa, a excepción del crecimiento de *S. paphiopedili* en 2 %, en donde el número de células fue similar.

Sympodiomyces paphiopedili, cepa del néctar floral, tuvo un crecimiento contrastante en relación a *C. apicola* ($t = 11.36$, g. l. = 8, $p < 0.0001$) y *C. cf. apicola* ($t = 312.89$, g. l. = 8, $p < 0.0001$). Su periodo de adecuación al medio resultó extremadamente lento en todas las concentraciones de glucosa y su mayor crecimiento sólo ocurrió en 2 %. En general el número de células observado fue mucho menor que en las cepas de *Candida*.

De forma interesante, las cepas procedentes de la miel, *C. apicola* y *C. cf. apicola*, no mostraron diferencias estadísticas entre sí en el crecimiento ($t = 2.10$, g. l. = 8, $p = 0.4727$, Ajuste Bonferroni), pero la respuesta en esta última fue ligeramente más rápida a 2 % de glucosa. Aunque no existieron diferencias significativas, se apreció la siguiente

tendencia: *C. apicola* creció más rápido en 40 % glucosa, pero en 60 % quien tuvo un rápido crecimiento fue *C. cf. apicola* (Cuadro 2). Por otra parte, las cepas aisladas del néctar floral (pero de especies distintas), *M. koreensis* y *S. paphiopedili*, tuvieron un crecimiento diferente, el cual fue mucho más lento en esta última cepa ($t = 10.56$, g. l. = 8, $p < 0.0001$).

En resumen, los ascomicetos *C. apicola*, *C. cf. apicola* y *M. koreensis* crecieron de forma más rápida en las concentraciones de 2 %, 10 % y 20 % de glucosa, a diferencia del basidiomiceto *S. paphiopedili* que en general creció muy lento. Asimismo, las dos primeras cepas produjeron un mayor número de células en las concentraciones de 40 % y 60 %. De las cepas aisladas en miel, ambas mostraron un rápido crecimiento en las tres primeras concentraciones y un crecimiento lento a 40 % y 60 %. De las cepas aisladas en néctar, sólo *M. koreensis* tuvo un crecimiento rápido en las tres primeras concentraciones, mientras que *S. paphiopedili* creció de forma extremadamente lenta en todas las concentraciones de glucosa. De las cuatro cepas, el crecimiento más rápido se registró en *M. koreensis* y el crecimiento más lento en *S. paphiopedili*, mientras que número máximo de células producidas se observó en *C. apicola*.

Morfología celular de levaduras

En *M. koreensis*, se observaron células de forma elipsoidal a cilíndricas, aisladas o en cadenas cortas, gemación polar y pseudohifas poco desarrolladas o ausentes (Figura 15). La prueba de Kruskal-Wallis indicó que entre los tratamientos evaluados existieron diferencias estadísticas en la longitud ($p < 0.05$) y el diámetro celular ($p < 0.05$). En esta cepa los incrementos de glucosa tuvieron un efecto variable en la reducción del tamaño celular e incluso a 10 % y 20 % el diámetro se incrementó ligeramente (Figura 16).

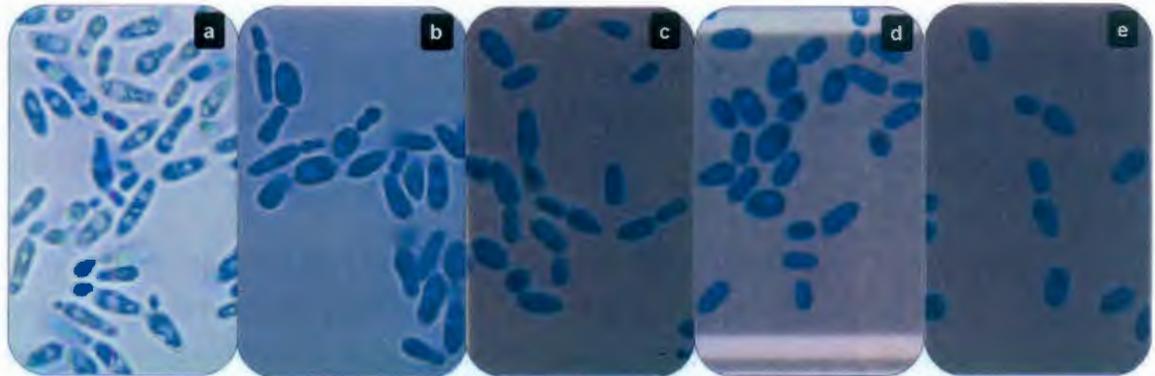


Figura 15. Células de *Metschnikowia koreensis* cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.

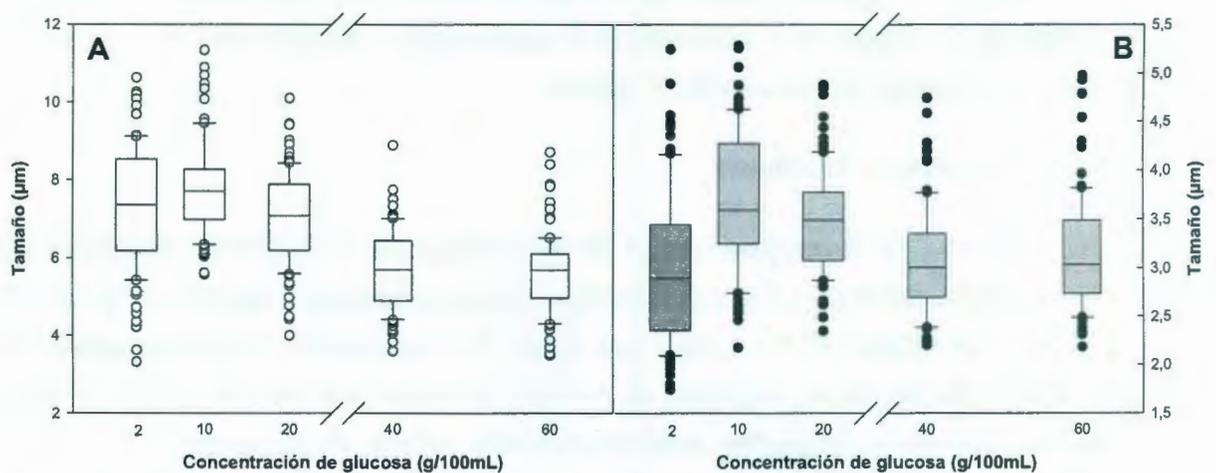


Figura 16. Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de *Metschnikowia koreensis*. En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.

Las células de *S. paphiopedili* se observaron ovoides a alargadas, aisladas, en pares o en cadenas cortas y en ocasiones se observaron pseudohifas (Figura 17). Se encontró que la longitud (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) y el diámetro (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) de las células fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos evaluados. En este caso, el incremento en la concentración de glucosa no tuvo un efecto muy pronunciado en la disminución del tamaño celular (Figura 18).

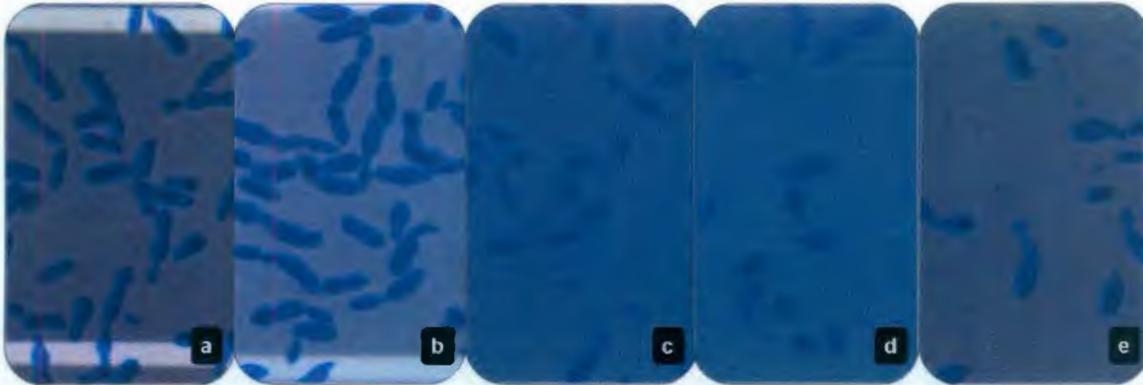


Figura 17. Células *Sympodiomyces paphiopedili* cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.

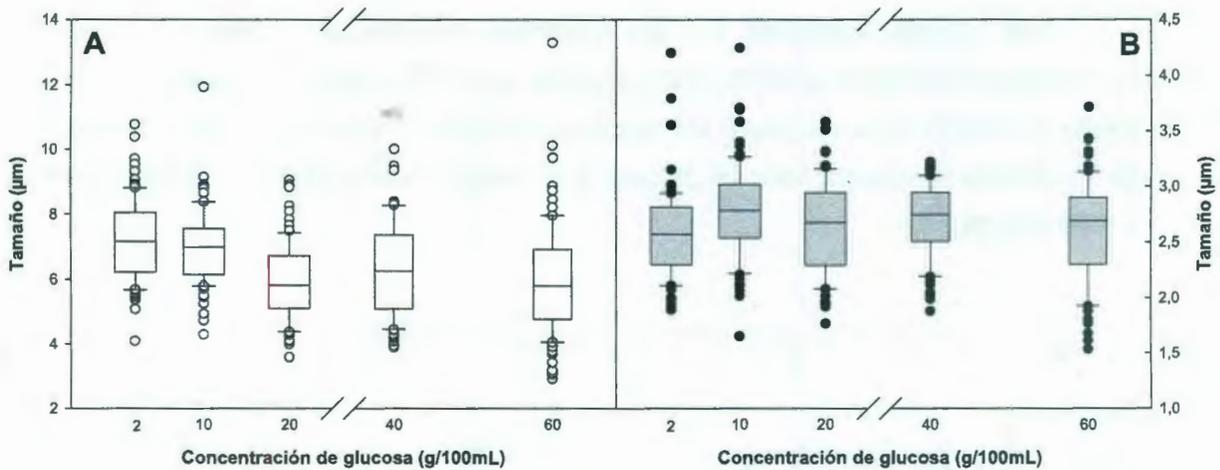


Figura 18. Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de *Sympodiomyces paphiopedili*. En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.

Las células de *C. apicola* tuvieron una forma de esférica a ovoide, y generalmente se observaron aisladas, aunque en ocasiones formaban pares y cadenas cortas de tres a cuatro células (Figura 19). No se observó formación de filamentos (hifas, pseudohifas) en ningún tratamiento evaluado.

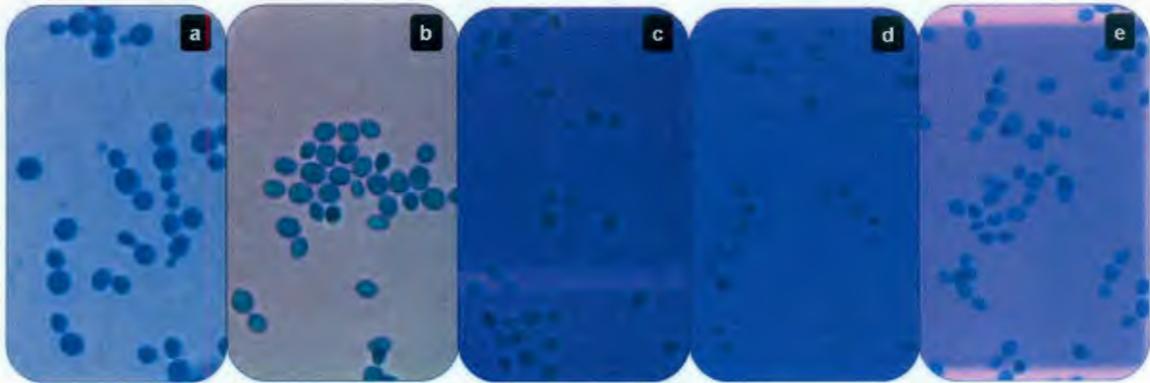


Figura 19. Células de *Candida apicola* cultivadas en GELP con a) 2 %, b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.

Las células cultivadas en los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas tanto en la longitud (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), como en el diámetro (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). Esto corroboró la reducción del tamaño celular en *C. apicola* conforme se incrementó la concentración de glucosa en el medio, siendo más pronunciado el efecto a 60% (Figura 20).

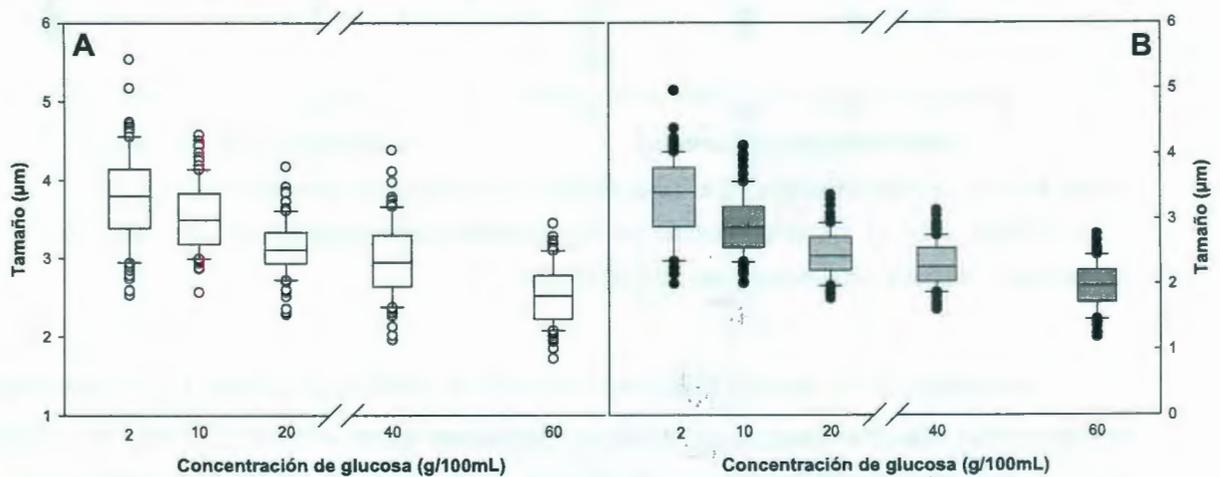


Figura 20. Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de *Candida apicola*. En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.

En *C. cf. apicola*, la morfología de las células fue similar a la cepa anterior, una forma esférica a ovoide, aisladas o formando pares y cadenas cortas de tres a cuatro células (Figura 21). No se observaron filamentos en ningún tratamiento. Esta cepa mostró diferencias significativas en la longitud (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) y el diámetro celular (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$) entre las distintas concentraciones de glucosa evaluadas. Nuevamente, se observó que el incremento en la concentración de este monosacárido ocasionó una reducción gradual en el tamaño celular (Figura 22).

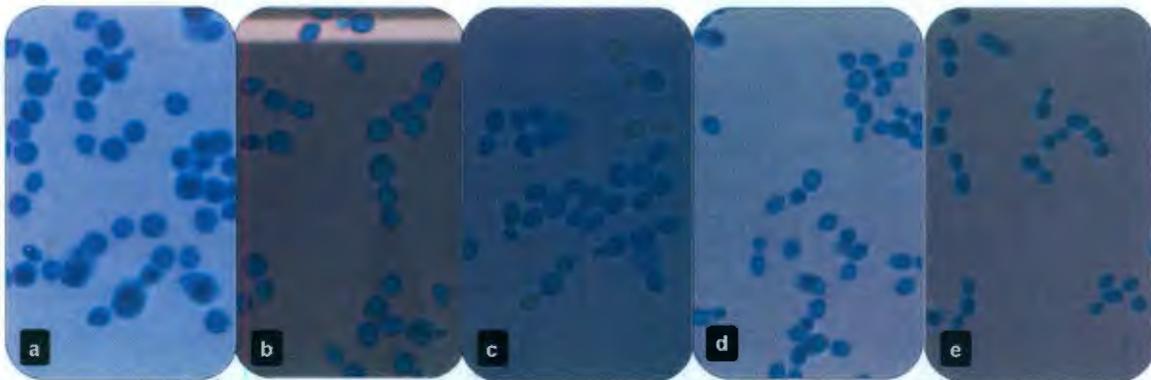


Figura 21. Células de *Candida cf. apicola* cultivadas en GELP con a) 2 % b) 10 %, c) 20 %, d) 40 % y e) 60 % de glucosa. Las células de las fotografías fueron teñidas con azul de lactofenol para observar su morfología, disposición, la longitud y el diámetro celular, y la presencia de filamentos a una magnificación de 1000X.

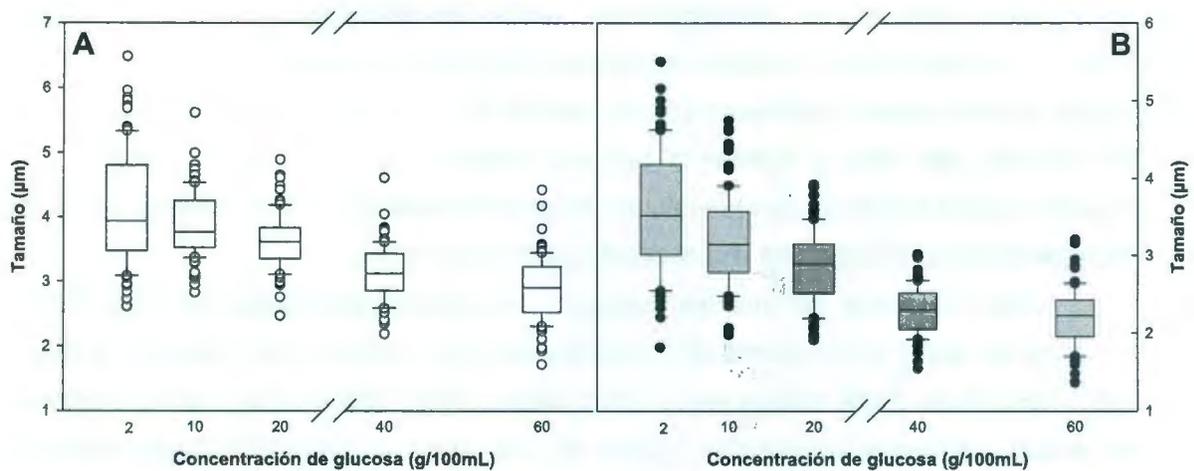


Figura 22. Efecto del incremento en la concentración de glucosa en el medio de crecimiento sobre A) la longitud y B) el diámetro celular de *Candida cf. apicola*. En el gráfico se representa la mediana y los percentiles 10, 25, 75 y 90.

DISCUSIÓN

De forma general, las cepas de estudio experimentaron una respuesta negativa en su crecimiento cuando la cantidad de glucosa se incrementó en el medio, siendo este efecto más pronunciado en las concentraciones de 40 % y 60 %, aunque cada cepa tuvo un comportamiento particular. La respuesta de *S. paphiopedili* (néctar) a los diferentes tratamientos resultó diferente a la observada en *M. koreensis* (néctar), *C. apicola* y *C. cf. apicola* (miel). El posible significado de estos resultados se discute a continuación.

Las cepas estudiadas en GELPA desarrollaron colonias de color blanco o color crema y ninguna mostró pigmentación. Las características de *C. apicola* y *C. cf. apicola* reportadas aquí (incluso su elevación central) concuerdan con las primeras descripciones que realizó Hajsig (1958) en esta especie, en cepas obtenidas del tracto intestinal de abejas, a excepción del color crema que reporta este autor, que pudo originarse por el medio de cultivo que utilizó (agar malta). Para *M. koreensis*, Hong *et al.* (2001) observaron colonias blancas y lisas, similares a las obtenidas en este estudio, aunque esos autores realizaron cultivos en agar 10 % extracto de malta. Sugiyama *et al.* (1991) registraron los mismos rasgos observados en este trabajo para las colonias de *S. paphiopedili*, esto es, un color crema, opacas y mucosas, pero sus cultivos los realizaron sobre agar malta.

En relación al crecimiento, ninguna de las cepas evaluadas tuvo una respuesta parecida a lo que teóricamente se espera de cepas osmófilas, sino más bien se comportaron como cepas "osmotolerantes" según las definiciones de Anand y Brown (1968) y Tokuoka (1993), esto es, mostraron tolerancia a elevadas concentraciones de azúcar pero su mejor crecimiento ocurrió cuando las concentraciones fueron reducidas. Por lo tanto, esto lleva a aceptar la segunda hipótesis propuesta en este trabajo, que propone que las levaduras que prevalecen en la miel y aisladas de éste, tendrán un mayor crecimiento en condiciones de alta concentración de azúcares.

Existe evidencia de que las levaduras han estado asociadas por largo tiempo (millones de años) a la cadena de transformación de néctar a miel (Bryszh-Herzberg, 2004; Rosa *et al.*, 2003; Gilliam *et al.*, 1990; Gilliam, 1979; Gilliam *et al.*, 1974), y esto las ha llevado a enfrentar la transición gradual de una menor a una mayor concentración de azúcares que acompaña la formación de este alimento (Polaino, 2006; Park, 1925), lo que resulta una fuerza selectiva que posiblemente ha estado actuando como un filtro (Herrera *et al.*, 2010) y a la vez moldeando algunos rasgos de su biología en general. La hipótesis

del filtro ambiental conduce a observar organismos filogenéticamente emparentados, y al menos en el néctar floral, este fenómeno se ha registrado, destacando como mecanismos selectivos la alta concentración de azúcares y los compuestos antimicrobianos presentes (Herrera *et al.*, 2010).

Metschnikowia koreensis

La cepa de *M. koreensis* fue la única que creció más rápido en bajas concentraciones de glucosa (2 %, 10 % y 20%), pero lo hizo más lento en 40 % y 60 %. De forma interesante, esta cepa se aisló en el néctar de *T. stans* (Canto y Herrera, 2012), el cual contiene altas cantidades de glucosa (48.03%, 79.1 mg/ml). Asimismo, el hecho de que Hong *et al.* (2001) la hayan aislado por primera vez en flores de *Ipomoea* y *Lilium* apoya la idea de su asociación al néctar. En general, diversas levaduras que habitan en el néctar pueden crecer a elevadas concentraciones de azúcares (Lachance, 2006), lo cual fue corroborado por Pozo *et al.* (2011), quienes observaron en el néctar una alta frecuencia de especies que pueden crecer a 50 % de glucosa, entre ellas *M. gruessii* y *M. reukafii*; esta última filogenéticamente cercana a *M. koreensis* (Hong *et al.*, 2001).

Brysch-Herzberg (2004), también observó que *M. gruessii* y *M. reukafii* predominaban en el néctar floral de plantas pertenecientes a diversas familias como Fabaceae, Lamiaceae, Ranunculaceae, Scrophulariaceae, entre otras, y realizó un amplio estudio sobre su respuesta a diferentes concentraciones de glucosa en medios de cultivo sólidos. Encontró que ambas especies crecían bien a una concentración de 50 %, pero cuando esta se incrementaba a 60 % su crecimiento era lento y débil, y a 70 % ninguna pudo crecer. Herrera *et al.* (2010) también observaron una alta frecuencia de *M. reukafii* en el néctar de *Helleborus foetidus*, planta con una alta concentración de azúcares en promedio (40.5 %). Otras especies como *M. lachancei* y *M. vanudenii* aisladas de insectos y flores también muestran un crecimiento a 50 % de glucosa (Giménez-Jurado *et al.*, 2003). En general, Lachance *et al.* (2001) encontraron que las levaduras de flores y néctar tenían la habilidad de crecer a concentraciones elevadas de glucosa (50 %).

La información previa lleva a pensar que *M. koreensis* puede colonizar fases tardías en el proceso de transformación de néctar a miel, como sería el caso del néctar que está siendo almacenado en las celdas o potes que no se encuentran operculados (cerrados) y en la miel ya “madura”, que se encuentra en las celdas o potes ya

operculados, y que se resguardan dentro de los nidos para su posterior utilización como alimento energético. No obstante, no se cuenta con información sobre su presencia en sitios dentro del nido de *M. beecheii*, pero sí se ha reportado en la miel de especies del género *Bombus*. Asimismo, especies como *M. reukaffii*, *M. gruessii* y *M. pulcherrima*, también se han reportado en el tracto digestivo y la miel de *Bombus* spp. (Brysch-Herzberg, 2004).

Los antecedentes indican que los miembros del género *Metschnikowia* normalmente se asocian a ambientes presentes en la relación flor-insecto (Pozo *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2008; Lachance *et al.*, 2001; Inglis *et al.*, 1993; Gilliam, 1979) en donde logran prosperar ante la alta concentración de azúcares. Se ha sugerido que la diversificación de plantas con flor e insectos asociados, ha influenciado la diversificación genética en *Metschnikowia* (Giménez-Jurado *et al.*, 2003), al grado de observar miembros especialistas, como se consideran *M. reukaffii* y *M. gruessii*.

La asociación de *M. koreensis* con *Bombus* spp. (Brysch-Herzberg, 2004) y otros insectos puede débilmente explicarse según lo observado por Hong *et al.* (2001), quienes encontraron que esta especie puede asimilar glucosamina, un amino azúcar común en el exoesqueleto de crustáceos y otros artrópodos, e incluso en hongos. Sin embargo, no existe información de que esta especie se alimente del cuerpo de las abejas. Lo que si se observa, es que la comunidad de levaduras en el néctar puede tener un comportamiento parásito, ya que pueden consumir los azúcares producidos por las flores y privar de éstos a los insectos (Herrera *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos muestran que *M. koreensis* es capaz de asimilar la glucosa en ambientes donde su concentración puede llegar hasta el 60 %, aunque su crecimiento es limitado.

Sympodiomyces paphiopedili

El largo tiempo de latencia y el lento crecimiento observado en la cepa de *S. paphiopedili* contrastan con lo observado en las cepas de *Candida* y *M. koreensis*. A pesar de ello, esta levadura pudo crecer en todas las concentraciones de glucosa evaluadas, aunque débilmente en 40 % y 60 %. El crecimiento favorable a bajas cantidades de glucosa, le da sentido a su aislamiento efectuado por Lizama (2011) en el néctar de la enredadera *M. aegyptia*, la cual no contiene altas concentraciones de glucosa (32.55%, 102.4 mg/ml).

Lo anterior, abre la posibilidad de sugerir que *S. paphiopedili* puede ser un habitante común del néctar floral, y con baja probabilidad, que se asocie a etapas posteriores del proceso de transformación del néctar a miel. Sin embargo, son pocos los datos para apoyar esta hipótesis, ya que después de su recién observación en *M. aegyptia*, no se ha aislado en el néctar de otras plantas ni en la miel de *M. beecheii* u otras abejas. El único reporte previo de esta especie fue el de Sugiyama *et al.* (1991) quienes la identificaron por primera vez en el néctar de la orquídea *Paphiopedilum primurinum* y observaron que era incapaz de crecer en 50 % de glucosa, sin embargo, la información del CBS-Knaw Fungal Biodiversity Center (2012) ratifica nuestros resultados, ya que reporta que *S. paphiopedili* es capaz de crecer en 50 % y 60 % de glucosa.

Si se analiza el crecimiento de *S. paphiopedili* considerando que pertenece al grupo de los basidiomicetos y de que *C. apicola*, *C. cf. apicola* y *M. koreensis* se incluyen en los ascomicetos, entonces la carencia de reportes de esta especie en hábitats ligados a la transformación de miel adquiere cierto sentido. Lachance (2006) apunta que es raro observar levaduras basidiomicetas en la microbiota del néctar, ya que esta secreción principalmente favorece especies fermentadoras, osmotolerantes y copiotróficas (organismos que crecen en altas concentraciones de nutrimentos orgánicos, como carbohidratos), la mayoría del orden Saccharomycetales perteneciente a los ascomicetos. Al parecer, el crecimiento de levaduras basidiomicetas es más sensible ante una baja disponibilidad de agua (bajos valores de a_w) que las ascomicetas (Tekolo *et al.*, 2010). Indudablemente, esta carencia de agua es cada vez mayor conforme avanza el proceso de transformación de néctar a miel y posiblemente limita la presencia de *S. paphiopedili* en la miel de *M. beecheii*. Al respecto, Brysch-Herzberg (2004) encontró que ninguno de los basidiomicetos aislados en el néctar pudo crecer en 50 % de glucosa y señala que el crecimiento de este grupo es afectado negativamente a concentraciones de 30-50 %, y menciona que estas concentraciones son comunes en el néctar floral, lo que explicaría la pobre representación de los basidiomicetos en esta secreción natural.

A pesar de ello, varias levaduras basidiomicetas como *Cryptococcus* y *Rhodotorula* están asociadas al néctar de las plantas (Pozo *et al.*, 2011; Herrera *et al.*, 2010; Mushtaq *et al.*, 2008; Mushtaq *et al.*, 2007; Mushtaq *et al.*, 2006; Sandhu y Waraich, 1985). Pero por su reducido número se han considerado como generalistas (alóctonos) (Lachance *et al.*, 2001), ya que ocurren en otras superficies vegetales como el cáliz floral (Brysch-Herzberg, 2004). La presencia de basidiomicetos como *Cryptococcus* y

Rhodotorula también se ha observado en la probóscis y el tracto intestinal de *Bombus* spp. (Brysch-Herzberg, 2004); en el cuerpo y miel de abejas sin aguijón (Rosa *et al.*, 2003); en el polen y la colmena de *A. mellifera* (Carvalho *et al.*, 2005; Segui-Crespo *et al.*, 1991); en el tracto intestinal y buche melífero de *Apis* spp., *Halictus* sp. y *Xylocopa* sp. (Sandhu y Waraich, 1985); en el polen y néctar floral (Inglis *et al.*, 1993) y en la corbícula y el polen almacenado (pan de abeja) de *A. mellifera* (Gilliam, 1979).

Actualmente, se desconoce si *S. paphiopedili* se asocia a los sustratos generados durante la formación de miel a excepción del néctar floral, aunque según lo encontrado aquí, puede crecer a concentraciones altas de glucosa, pero de forma muy débil. Es posible que su aislamiento en el néctar de *M. aegyptia* (Canto y Herrera, 2012; Lizama, 2011) pudo deberse a que estaba presente en otros hábitats que ofrece la flor como el polen y el perianto (Pozo *et al.*, 2011), y eventualmente llegó a los nectarios debido a su proximidad (Brysch-Herzberg, 2004). Lo que sí se conoce es que *S. paphiopedili* pertenece a un grupo de hongos parásitos comunes en plantas, los Ustilaginomycetes (Piepenbring, 2001). Además, Russo *et al.* (2006) mencionan que los hongos basidiomicetos son más versátiles en nutrición (saprótrofos y patógenos) que los ascomicetos debido a que son un grupo filogenéticamente heterogéneo.

En un trabajo Golubev *et al.* (2004), encontraron que *S. paphiopedili* producía un glicolípido extracelular con actividad fungicida contra diversos hongos basidiomicetos y ascomicetos, siendo más sensibles estos últimos. Pero además, esta secreción tuvo un efecto negativo contra diferentes levaduras, las cuales también resultaron sensibles, entre ellas cepas de los géneros *Candida* y *Metschnikowia*.

Candida apicola y *Candida* cf. *apicola*

Las dos cepas de *Candida* evaluadas crecieron en las diferentes concentraciones de glucosa, pero con ciertas diferencias entre ellas. El crecimiento más rápido de *C. apicola* a concentraciones intermedias de glucosa, en específico a 20 %, puede indicar la preferencia de esta cepa a ambientes con altos contenidos de azúcar. Esto tiene sentido si se considera que se aisló en las ánforas de miel de *M. beecheii*, en donde la miel ha madurado y existe una alta concentración de monosacáridos, glucosa 28 % y fructosa 32 %. De forma opuesta, el rápido crecimiento de *C. cf. apicola* que solo se observó en la concentración de 2 %, revela que esta cepa es afectada por altas concentraciones de

glucosa y esto puede explicar su presencia en las ánforas semi-lLENas de miel de *M. beecheii*, en donde la miel aún no es madura y la concentración de azúcares todavía no es máxima, sino que continúa con incrementos graduales. Los datos obtenidos del CBS-Knaw Fungal Biodiversity Center, demuestran que *C. apicola* es capaz de crecer en 50 % de glucosa, pero señalan que a 60 % esto es variable. Hajsig (1958) también detectó que esta especie logró crecer en 60 % de glucosa.

La capacidad de crecer de *C. apicola* a altas concentraciones de glucosa, puede ser un rasgo de carácter evolutivo, ya que es compartido por varias especies del género aisladas en flores, néctar, abejas y miel (Mushtaq *et al.*, 2008; Mushtaq *et al.*, 2007; Mushtaq *et al.*, 2006; Brysch-Hezberg, 2004). Esto lo demuestra Gilliam (1979), al aislar algunas especies de *Candida* en polen de *Prunus comunis* y en el polen almacenado (pan de abejas) en las celdas de *Apis mellifera*, observando que la mayoría crecía a elevadas presiones osmóticas. Brysch-Hezberg (2004), aisló a *C. bombi* en néctar floral, individuos y miel de *Bombus* spp. y observó que esta especie tuvo un buen crecimiento en 50 % de glucosa, fue lento en 60 % y nulo a 70 %; en *C. rancensis* obtenida del néctar y del tracto digestivo de *Bombus* sp., observó un crecimiento lento en 50 % de glucosa, pero este fue nulo en 60 % y 70 %. Mushtaq *et al.* (2006) estudiaron seis especies de *Candida* del néctar de *Bombax cieba* y *Canna indica*, de las cuales cinco crecieron en 50 % de glucosa y sólo una (*C. versatilis*) creció en 60 %. En un trabajo similar, Mushtaq *et al.* (2007) identificaron que *C. magnoliae* y *C. succiphila* procedentes del néctar de *Hibiscus rosa-sinensis* e *Ixora coocinea*, crecieron en 50 % de glucosa, pero sólo *C. magnoliae* lo hizo en 60 %. Mushtaq *et al.* (2008) con cinco diferentes especies de *Candida* del néctar de *Pancratium biflorum*, observaron que sólo cuatro prosperaron en 50 % de glucosa y ninguna en 60 %. De forma opuesta, Pimentel *et al.* (2005) reportan que *C. riodecensis* encontrada en el néctar y polen de la abeja *Megachile* sp., así como *C. cellae* aislada en el néctar y polen de *Centris dorsata*, fueron incapaces de crecer en 50 % glucosa.

Los antecedentes sugieren que *C. apicola* es capaz de prosperar en sitios asociados a la relación néctar-abejas-miel (Rosa *et al.*, 2003), por ejemplo, Hajsig (1958) realizó su aislamiento por primera vez en el intestino de las abejas. Asimismo, Rosa *et al.* (2003) aislaron diversas cepas pertenecientes al complejo *C. apicola* (un grupo de especies aún no identificadas y emparentadas a *C. apicola*) en individuos y miel de *Melipona quadrifasciata*, pero no confirmaron su identidad debido a que los límites de *C. apicola* no son claros aún y a que esta especie es fisiológicamente heterogénea. La

colonización del néctar por especies de *Candida* parece algo común y se expone en estudios como los de Inglis *et al.* (1993), que identificaron a *C. bombicola* en el néctar, Pimentel *et al.* (2005) aislaron a *C. riocensis* en provisiones de néctar y polen de *Megachile* sp. y a *C. cellae* en provisiones de néctar y polen en *Centris dorsata*. Herrera *et al.* (2008) también registraron especies de *Candida* en el néctar de *H. foetidus* y Sandhu y Waraich (1985) encontraron un gran número de especies de este género en el néctar de diversas plantas.

Al parecer, las especies de *Candida* logran colonizar los sitios perteneciente a las fases posteriores del proceso de transformación de néctar a miel, como aparece en Gilliam *et al.* (1974), al observar en varios estudios en la década de 1960, la presencia de diversas especies de este género en la región digestiva e intestinal de las abejas (*i. e. A. mellifera*), entre ellas *C. apicola*. Por su parte, Sandhu y Waraich (1985) aislaron diversas especies del género en el tracto intestinal de abejas como *Xylocopa*, *Apis* y *Halictus*, encontrando que casi todas ocurrieron en el néctar de la flora asociada a las abejas, la cual albergó un número mayor. Herrera *et al.* (2010) al analizar la glosa de *Bombus* spp. aislaron a *C. bombi* y *C. friedrichii*. Gilliam *et al.* (1974) identificaron en la región intestinal de *A. mellifera* a las especies *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. magnoliae*, y Gilliam (1997) también señala que *C. parapsilosis* colonizó el intestino de *A. mellifera*. Por su parte, Brysch-Herzberg (2004) observó diversas especies de *Candida* en el néctar floral, la probóscis y el tracto digestivo de *Bombus* spp., y solo una especie en la miel.

La miel de las abejas también es un sitio donde se observan miembros de este género. Al respecto, Marvin *et al.* (1931) mencionan que las levaduras no son eliminadas durante la maduración de miel, aun cuando llega a ser elevada la concentración de azúcares. Seguí-Crespo *et al.* (1991) hallaron varias especies de *Candida* en las estructuras del nido de *A. mellifera* e incluso en sus larvas. Carvalho *et al.* (2005) observaron *C. magnoliae* y *C. parapsilosis* en muestras de miel a, mientras que Carvalho *et al.* (2010) aislaron a *C. magnoliae* y *C. sorbosivorans* en esta sustancia natural. Pérez-Sánchez *et al.* (1997) sólo detectaron especies de este género en dos muestras de miel de las 18 que fueron analizadas. Rosa *et al.* (2003) reportaron diversas especies de *Candida* en asociación con abejas sin aguijón, observándose en el cuerpo y la miel de estos insectos.

Se sugiere que algunas especies de *Candida* juegan un rol esencial en diversas especies de abejas, al incrementar la calidad nutritiva del polen almacenado (Teixeira *et*

al., 2003). Esta hipótesis también la comparten Rosa *et al.* (2003), quienes apuntan que *C. magnoliae*, *C. bombicola* y *C. batistae*, posiblemente mantienen un vínculo mutualista con abejas, ya que pertenecen al clado *Starmerella*, un grupo en donde casi todos los integrantes se asocian a las abejas y a sus hábitats. En relación a esto, Gilliam (1979) aisló especies de *Candida* en el polen almacenado (pan de abeja) de la abeja *A. mellifera*.

Morfología y dimensión celular

Hong *et al.* (2001) en la primera descripción realizada de *M. koreensis* cultivada en extracto de malta 5 %, observaron al microscopio una morfología similar a la reportada en esta tesis. El tamaño celular, la longitud y el diámetro observados en esta tesis se hallan dentro del rango encontrado por estos autores, aunque aquí se obtuvo una tendencia a menor tamaño en ambos rasgos, lo que seguramente se debió al incremento de glucosa.

Para *S. paphiopedili*, la forma de las células, las dimensiones y el crecimiento simpodial con formación de conidios en el ápice celular que se observó en laboratorio, coinciden con las primeras observaciones hechas por Sugiyama *et al.* (1991), aunque estos autores utilizaron como medio de cultivo extracto de malta.

La morfología celular de *C. apicola* y *C. cf. apicola* observadas en este trabajo, concuerdan con las descripciones iniciales realizadas por Hajsig (1958) e incluso las dimensiones celulares se hallan dentro del rango reportado por este autor, aun cuando sus trabajos fueron realizados en cultivos en extracto de malta.

La longitud y el diámetro celular se redujeron de forma generalizada e independientemente de la cepa en cuestión, como lo indicaron las pruebas estadísticas. Esta respuesta parece común en un microorganismo cuando se expone a un ambiente con elevada concentración de solutos. Rose (1975) observó que cuando *C. apicola*, *C. globosa* y *Zygosaccharomyces rouxii* crecieron en soluciones concentradas de sacarosa y polietilenglicol (peso molecular 200), existió una reducción del volumen celular y menciona que este efecto posiblemente se debió a un equilibrio de la concentración intracelular de solutos con el ambiente, lo cual involucró la pérdida de agua por ósmosis. Asimismo, Marvin *et al.* (1931) en estudio realizado con cepas aisladas de la miel, observaron que *Z. mellis* redujo su tamaño celular cuando se incrementó la cantidad de miel en el medio de cultivo. Morris *et al.* (1983) también encontraron una reducción del volumen celular en *S. cerevisiae* cuando fue expuesta a soluciones concentradas de cloruro de sodio (NaCl), y

mencionan que la causa de la pérdida de agua en las células fue debido a la alta presión osmótica.

El débil efecto que tuvieron las concentraciones de glucosa en la reducción del tamaño celular de *S. paphiopedili* respecto a las otras cepas, posiblemente es porque esta especie pertenece al grupo de los basidiomicetos, los cuales exhiben diferencias en la composición de lípidos de la membrana en relación a los ascomicetos (Golubev *et al.*, 2004), grupo que incluye a las restantes cepas estudiadas, lo que puede facilitar el transporte activo en unas cepas y en otras no. Al respecto, O'Brien y Ralph (1966) señalan que existen diferencias en la composición de azúcares de la pared celular entre ambos grupos de hongos, por ejemplo, no se ha registrado en los ascomicetos la presencia de cadenas complejas de glucanos. Finalmente, Kreger-van y Veenhuis (1971), señalan que la estructura lamelar de la pared celular de los basidiomicetos difiere de la observada en los ascomicetos como *S. cerevisiae*. Sin embargo, lo anterior es un tema que debe estudiarse para determinar si estas características influyen en la respuesta observada. Cabe señalar que en este trabajo la viabilidad de las células no se analizó.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, J. C. y A. D. Brown (1968). Growth rate patterns of the so-called osmophilic and non-osmophilic yeasts in solutions of polyethylene glycol. *Journal of General Microbiology*, 52, 205-212.
- Anderson, K. E., T. H. Sheehan, B. J. Eckholm, B. M. Mott y G. Hoffman (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58, 431-444.
- Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow (2007). *Yeasts: Characteristic and Identification*. Cambridge University Press. Cambridge, United Kindom. 1139 p.
- Becker, J. M., G. A. Caldwell y E. A. Zachgo (1990). *Biotechnology: a Laboratory Course*. Academic Press Inc. San Diego California, USA. 232 p.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 87-100.
- Canto, A. y C. M. Herrera (2012). Micro-organisms behind the pollination scenes: microbial imprint on floral nectar sugar variation in a tropical plant community. *Annals of Botany*, 110, 1173-1183.

- Canto, A., C. M. Herrera, M. Medrano, R. Pérez e I. M. García (2008). Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany*, 95, 315-320.
- Carvalho, C. M., A. Rocha, M. L. F. Estevinho y A. Choupina (2005). Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 11-17.
- Carvalho, C. M., S. Meirinho, M. L. F. Estevinho y A. Choupina (2010). Yeast species associated with honey: different identification methods. *Archivos de Zootecnia*, 59, 103-113.
- CBS-Knaw Fungal Biodiversity Center (2012). Disponible en: <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICS.aspx?Table=Yeasts+species&Name=Candida+apicola&Fields=All&ExactMatch=T>. [Acceso 10 Agosto 2012].
- Gilliam, M. (1979). Microbiology of the pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10, 43-53.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Gilliam, M., D. W. Roubik y B. J. Lorenz (1990). Microorganism associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21, 89-97.
- Gilliam, M., L. J. Wickerham, H. L. Morton y R. Martin (1974). Yeasts isolated from honey bees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-D and antibiotics. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24, 349-356.
- Giménez-Jurado, G., C. P. Kurtzman, W. T. Starnes e I. Spencer-Martins (2003). *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. and *Metschnikowia lachancei* sp. nov., from flowers and associated insects in North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1665-1670.
- Golubev, W. I., T. V. Kulakovskaya, E. V. Kulakovskaya y N. W. Golubev (2004). The fungicidal activity of an extracellular glycolipid from *Sympodiomyces paphiopedili* Sugiyama *et al.* *Microbiology*, 73, 724-728.
- Hajsig, M. (1958). *Torulopsis apicola* nov. spec., new isolates from bees. *Antonie van Leeuwenhoek*, 24, 18-22.

- Herrera, C. M., A. Canto, M. I. Pozo y P. Bazaga (2010). Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 747-754.
- Herrera, C. M., C. de Vega, A. Canto y M. I. Pozo (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany*, 103, 1415-1423.
- Herrera, C. M., I. M. García y R. Pérez (2008). Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, 89, 2369-2376.
- Herrera C. M., M. I. Pozo y P. Bazaga (2012). Jack of all nectars, master of most: DNA methylation and the epigenetic basis of niche width in a flower living yeast. *Molecular Ecology*, 21, 2602-2616.
- Hong, S. G., J. Chun, H. W. Oh y K. S. Bae (2001). *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1927-1931.
- Inglis, G. D., L. Sigler y M. S. Goettel (1993). Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microbial Ecology*, 26, 125-143.
- Kreger-van, N. y M. Veenhuis (1971). A comparative study of the cell wall structure of basidiomycetous and related yeasts. *Journal of General Microbiology*, 68, 87-95.
- Lachance, M. A. (2006). Yeast biodiversity: how many and how much?, en: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, C. Rosa y P. Gábor (eds.). Springer-Verlag. Berlín, Germany. pp. 1-9.
- Lachance, M. A., W. T. Stamer, C. A. Rosa, J. M. Bowles, J. S. F. Barker y D. H. Janzen (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 1, 1-8.
- Lizama, B. (2011). Levaduras asociadas a dos especies de abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) y a tres especies de la flora nectarífera de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. 77 p.
- Marvin, G. E., W. H. Peterson, E. B. Fred y H. F. Wilson (1931). Some of the characteristics of yeasts found in fermenting honey. *Journal of Agricultural Research*, 43, 121-131.
- Morris, G. J., L. Winters, G. E. Coulson y K. J. Clarke (1983). Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 129, 2023-2034.

- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2006). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Bombax cieba* and *Canna indica* flower. *Pakistan Journal Botany*, 38, 1279-1288.
- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2007). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ixora coccinea* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 39, 1367-1376.
- Mushtaq, M., A. Jamal y S. Nahar (2008). Biodiversity of yeast mycoflora in nectar of *Malvaviscus arboreus* and *Pancratium biflorum* flowers. *Pakistan Journal Botany*, 40, 877-885.
- O'Brien, R. W. y B. J. Ralph (1966). The cell wall composition and taxonomy of some Basidiomycetes and Ascomycetes. *Annals of Botany*, 30, 831-843.
- Park, W. (1925). The storing and ripening of honey by honeybees. *Journal of Economic Entomology*, 18, 405-410.
- Pérez-Sánchez, M. C., F. del Baño-Breis, M. E. Candela-Castillo y C. Egea-Gilabet (1997). Flora microbiana en mieles de la región de Murcia, España. *Anales de Biología*, 22 (Biología Molecular y Microbiana), 155-164.
- Piepenbring, M. (2001). Smut fungi (Ustilaginomycetes and Microbotryales, basidiomycota) in Panama. *Revista de Biología Tropical*, 49, 411-428.
- Pimentel, M. R. C., Y. Antonini, R. P. Martins, M. A. Lachance, y C. A. Rosa (2005). *Candida riococensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research*, 5, 875-879.
- Polaino, C. (2006). *Manual Práctico del Apicultor*. Editorial Cultural S.A. Madrid, España. 528 p.
- Pozo, M. I., C. M. Herrera y P. Bazaga (2011). Species richness of yeast communities in floral nectar of southern spanish plants. *Microbial Ecology*, 61, 82-91.
- Quintero-Ramírez, R. (1981). *Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicaciones*. Editorial Alhambra-Mexicana. México. D. F., México. 332 p.
- Rosa, C. A., M. A. Lachance, J. O. C. Silva, A. C. P. Teixeira, M. M. Marini, Y. Antonini y R. P. Martins (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4, 271-275.
- Rose, D. (1975). Physical responses of yeast cells to osmotic shock. *Journal of Applied Bacteriology*, 38, 169-175.

- Russo, G., D. Libkind, J. P. Sampaio y M. Van Broock (2006). Levaduras del río Agrío y el lago Caviahue, un ambiente acuático ácido de origen volcánico (Neuquén, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 41, 167-175.
- Sandhu, D. K. y M. K. Waraich (1985). Yeasts associated with pollinating bees and flower nectar. *Microbial Ecology*, 11, 51-58.
- Seguí-Crespo, D., C. Betancourt, A. Berrios, O. Pérez-Laguillo y D. Pesante (1991). Catastro de levaduras presentes en colmenas de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) en el área oeste de Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, 27, 198-200.
- Sugiyama, J., K. Tokuoka, S. Suh, A. Hirata y K. Komagata (1991). *Sympodiomyopsis*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar. *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, 95-108.
- Teixeira, A. C. P., M. M. Marini, J. R. Nicoli, Y. Antonini, R. P. Martins, M. A. Lachance y C. A. Rosa (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 339-343.
- Tekolo, O. M., J. Mackenzie, A. Botha y B. A. Prior (2010). The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 10, 482-491.
- Tokuoka, K. (1993). Sugar-and-salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 101-110.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, en: *The Yeasts: a Taxonomic Study*, C. P. Kurtzman y J. W. Fell (eds). Elsevier. Amsterdam. Netherlands. pp. 77-105.

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

DISCUSIÓN GENERAL

Las curvas de calibración obtenidas en el capítulo II para las cepas de estudio, indicaron que la absorbancia puede ser un parámetro confiable para estimar el crecimiento celular, ya que los resultados calculados con base en las curvas de calibración fueron similares a los obtenidos experimentalmente contando células. Sin embargo, aunque la absorbancia se considera un predictor confiable, ciertas limitaciones inherentes a la técnica hacen necesaria la calibración específica (Pringle y Mor, 1975). De forma interesante, las mejores relaciones entre la absorbancia y los conteos celulares se observaron en *C. cf. apicola* y *S. paphiopedili* en donde los resultados de ambas técnicas fueron casi idénticos. Pero en *S. cerevisiae* y *M. koreensis* ocurrió lo contrario, ya que se observaron diferencias entre ambos parámetros. Hasta ahora, se desconocen las causas que puedan explicar porqué en las dos primeras cepas, la absorbancia estimó acertadamente el crecimiento y en las otras dos cepas no. Existen diversos factores a considerar, como son las diferencias en la morfología y el tamaño celular expuestas en el capítulo III, el estado fisiológico prevaliente (Baty *et al.*, 2002) y posiblemente los cambios en el medio de cultivo por agotamiento de nutrientes o acumulación de metabolitos.

Las dos cepas aisladas del néctar, *M. koreensis* y *S. paphiopedili* fueron capaces de crecer en las diferentes concentraciones de glucosa evaluadas, aunque esta última lo hizo de manera extremadamente lenta. Estas levaduras se incluyen en dos linajes diferentes dentro de los hongos, la primera en los ascomicetos y la segunda en los basidiomicetos. Existe evidencia de que este último grupo no tolera altas concentraciones de glucosa y una baja disponibilidad de agua, lo que puede explicar el crecimiento observado en *S. paphiopedili* (Tekolo *et al.*, 2010; Brysch-Herzberg, 2004). Herrera *et al.* (2010) mencionan que el néctar es un ambiente a veces extremo donde proliferan levaduras especialistas que toleran altas presiones osmóticas, y es posible que la comunidad de basidiomicetos en el néctar sea menos importante y muestre menos asociación.

A pesar de que las dos cepas de *Candida* son genéticamente cercanas su crecimiento en las distintas concentraciones de glucosa fue diferente, *C. apicola* creció más rápido a concentraciones intermedias mientras *C. cf. apicola* lo hizo a

concentraciones bajas. Pozo *et al.* (2011), señalan que las cepas de una misma especie pueden presentar variación intra-específica que desencadena distintas respuestas frente a bajas presiones osmóticas. Además, Walker (1998) menciona que las levaduras que ocupan diferentes nichos exhiben una gran especialización del hábitat y una selectividad nutricional. En este sentido, se ha mencionado que *C. apicola* es una especie fisiológicamente heterogénea (Rosa *et al.*, 2003).

En relación a la presencia de *C. apicola* y *C. cf. apicola* en la miel de *M. beecheii*, Rosa *et al.* (2003), sugieren que las levaduras halladas en la miel pueden ser metabólicamente activas y utilizar los azúcares para crecer e incluso adicionar sustancias que mejoran su calidad nutritiva. Aunque las últimas etapas de la maduración de la miel traen consigo un incremento en la cantidad de azúcares fácilmente asimilables por los microorganismos como las levaduras, un fenómeno que ocurre en esta sustancia y que posiblemente evita esto, es la pérdida de agua, lo cual eleva la presión osmótica y reduce el crecimiento microbiano al existir menos agua disponible.

En general, se ha mencionado que las especies de *Candida* y *Metschnikowia* muestran una afinidad con las abejas melíferas y sus recursos nutricionales, y esto tiene sentido si consideramos que se ubican dentro del clado *Starmerella*, grupo que al parecer ha evolucionado en íntima asociación con las abejas, ya que todos los miembros integrantes se han aislado en abejas, nidos y alimentos asociados (Rosa *et al.*, 2003; Lachance *et al.*, 2001). Gilliam *et al.* (1990) mencionan que la microbiota asociada a las abejas de forma mutualista puede favorecer la preservación y protección (Gilliam, 1997) de los alimentos almacenados en la colmena, y además realizar su pre-digestión e incrementar su calidad nutritiva (Hoffman *et al.*, 2009). Otros autores señalan que la principal función de las levaduras ascomicetas en la alimentación de los insectos, puede ser la conversión de minerales o de otros compuestos nitrogenados menos complejos a una mezcla enriquecida de proteínas y otros nutrimentos benéficos (Herrera y Ulloa, 1998).

La mayoría de los estudios sobre el crecimiento de levaduras a altas concentraciones de azúcares (a veces designadas osmófilas) se han desarrollado en medios sólidos, los cuales arrojan resultados cualitativos que difícilmente se pueden comparar con los aquí expuestos. Aunque todas las cepas de levaduras estudiadas crecieron en las cinco concentraciones de glucosa, esta respuesta fue diferente entre ellas. Lo anterior es difícil de observar en experimentos realizados en cajas de Petri con

medio sólido. Considerando las respuestas de crecimiento y las concentraciones que Kurtzman *et al.* (2003) establecen, es posible señalar que *C. apicola* y *C. cf. apicola* son cepas que califican como "levaduras osmotolerantes". La contribución importante de esta investigación fue que se pudieron reconocer niveles en la respuesta de osmotolerancia, los cuales indudablemente contribuyen a entender la ecología y aspectos relacionados a la evolución de estas levaduras. Es importante señalar que una limitación de este trabajo, fue que no se determinó la viabilidad de las células en los experimentos.

En resumen, considerando el proceso de transformación de néctar a miel, se puede sugerir que *S. paphiopedili* sólo prevalecerá en el néctar donde existen condiciones moderadas de concentración de azúcares, ya que no mostró ser osmotolerante. La cepa de *M. koreensis* prevalecerá en el néctar y con menor probabilidad en la miel, ya que no mostró una clara respuesta de osmotolerancia, y finalmente, las cepas de *C. apicola* y *C. cf. apicola* es posible que prevalezcan en el néctar y con mayor probabilidad en sitios con altas concentraciones de azúcares como la miel, ya que mostraron ser cepas osmotolerantes. En general, se observó que las cepas del néctar mostraron un menor crecimiento a elevadas concentraciones de glucosa, mientras que las cepas de miel tuvieron un mayor crecimiento en estas mismas condiciones.

CONCLUSIONES

- El método óptico de absorbancia fue una herramienta confiable para estimar el crecimiento celular en las diferentes cepas de levaduras, pero debido a la pérdida de proporcionalidad que se da cuando los valores de concentración celular son elevados, es conveniente utilizar en forma simultánea otra forma de estimación (e. g. conteos celulares, biomasa, etc.).
- En general, las curvas de calibración (absorbancia - conteo celular) permitieron predicciones confiables del crecimiento celular en las cepas de levaduras evaluadas en este estudio.
- *Candida apicola* y *C. cf. apicola* aisladas en la miel, mostraron en algún grado, crecimiento a elevadas concentraciones de glucosa, lo que permite reconocerlas como "levaduras osmotolerantes". Aunque la cepa de *M. koreensis* creció a altas concentraciones de glucosa, no se observó una clara respuesta de osmotolerancia y no se designó como osmotolerante.

- El rápido crecimiento de *C. apicola* en concentraciones intermedias de glucosa posiblemente indica su preferencia por hábitats más ricos en azúcares, y por el contrario, el rápido crecimiento en 2 % de glucosa de *C. cf. apicola* tal vez refleje su necesidad de ambientes con menor concentración de azúcares.
- La cepa de *S. paphiopedili* creció en todas las concentraciones de glucosa, pero esto fue limitado y extremadamente lento en comparación con las demás especies y solo produjo altas densidad celulares a 2 %. Basados en su cinética de crecimiento (velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación) a altas concentraciones de glucosa, esta cepa no se consideró como "osmotolerante". Su lento crecimiento probablemente se debe a su ubicación dentro del grupo de los basidiomicetos, los cuales muestran menor habilidad para tolerar altas concentraciones de azúcares.
- Todas las cepas de levaduras evaluadas en este trabajo, redujeron su tamaño celular cuando se incrementó la concentración de glucosa, aunque en *S. paphiopedili* este efecto negativo fue poco evidente.
- Se sugiere que *M. koreensis* y *S. paphiopedili* no son cepas osmotolerantes y prevalecerán mejor en el néctar floral, mientras que *C. apicola* y *C. cf. apicola* corresponden a cepas osmotolerantes que sin mayor problema prevalecerán en miel, aunque posiblemente también en el néctar.

PERSPECTIVAS

- Este trabajo generó información relevante sobre la respuesta de levaduras a elevadas concentraciones de glucosa. Otro aspecto que merece evaluarse es la respuesta a concentraciones aún más elevadas como 70 % u 80 % de glucosa tratando de simular las concentraciones de la miel, e incluso experimentar con otros azúcares como fructosa y sacarosa, y soluciones equimolares de glucosa y fructosa.
- En relación a las cepas de *C. apicola* y *C. cf. apicola*, sería interesante realizar experimentos de crecimiento adicionando al medio de cultivo miel de *M. beecheii*, que es el sustrato natural donde fueron aisladas, ya que esta miel contiene otros componentes que pueden afectar o favorecer el crecimiento de la microbiota presente.

- Es necesario realizar experimentos de crecimiento con *M. koreensis* y *S. paphiopedili* utilizando como medio de cultivo el néctar floral donde fueron aisladas, ya que esto arrojaría información valiosa, considerando que esta solución contiene también diversas sustancias e incluso antimicrobianos. Si esto no es posible, otra opción sería experimentar con un néctar artificial basado en la composición de azúcares de la planta en cuestión, a fin de explorar la posible selectividad hacia los azúcares presentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baty, F., J. P. Flandrois y M. L. Delignette-Muller (2002). Modeling the lag time of *Listeria monocytogenes* from viable count enumeration and optical density data. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5816-5825.
- Brysch-Herzberg, M. (2004). Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 87-100.
- Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Gilliam, M., D. W. Roubik y B. J. Lorenz (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, 21, 89-97.
- Herrera, C. M., A. Canto, M. I. Pozo y P. Bazaga (2010). Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B*, 277, 747-754.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). *El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada*. Fondo de Cultura Económica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F., México. 552 p.
- Hoffman, G. D., D. Sammataro y R. Alarcón (2009). The importance of microbes in nutrition and health of honey bee colonies. *American Bee Journal*, 149, 583-584.
- Kurtzman, C. P., T. Boekhout, V. Robert, J. W. Fell y T. Deak (2003). Methods to identify yeasts, en: *Yeast in Food*, T. Boekhout y V. Robert (eds.). Woodhead Publishing Limited. Neusäss, Germany. pp. 69-121.

- Lachance, M. A., W. T. Starmer, C. A. Rosa, J. M. Bowles, J. S. F. Barker y D. H. Janzen (2001). Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 1, 1-8.
- Pozo, M. I., C. M. Herrera y P. Bazaga (2011). Species richness of yeast communities in floral nectar of southern spanish plants. *Microbial Ecology*, 61, 82-91.
- Pringle, J. R. y J. R. Mor (1975). Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem, en: *Methods in Cell Biology. Volume XI Yeast Cells*, D. M. Prescott (ed.). Academic Press. New York, USA. pp. 131-168.
- Rosa, C. A., M. A. Lachance, J. O. C. Silva, A. C. P. Teixeira, M. M. Marini, Y. Antonini y R. P. Martins (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research*, 4, 271-275.
- Tekolo, O. M., J. Mackenzie, A. Botha y B. A. Prior (2010). The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Research*, 10, 482-491.
- Walker, G. M. (1998). *Yeast. Physiology and Biotechnology*. Wiley. Chichester, England. 321 p.