



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**“EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA SOBRE MICROORGANISMOS DE INTERÉS SANITARIO PRESENTES EN ALIMENTO DESTINADO PARA LA CRIANZA MASIVA DE *Bombus impatiens*”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Presenta:

Biól. Erika Beatriz Alvarez Hidalgo

Dirigida por:

Dr. Juan Campos Guillén

*Santiago de Querétaro, Qro., diciembre de 2017*



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**“Efecto de la radiación gamma sobre microorganismos de interés sanitario  
presentes en alimento destinado para la crianza masiva de *Bombus  
impatiens*”**

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**Presenta:**

Biól. Erika Beatriz Alvarez Hidalgo

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Juan Campos Guillén  
Director

Dr. Moisés Alejandro Vázquez Cruz  
Co-director

Dr. Miguel Angel Ramos López  
Asesor

Dr. Andrés Cruz Hernández  
Asesor

Dr. Sergio Romero Gómez  
Asesor

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad de Química

  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre 2017

## RESUMEN

Los abejorros (*Bombus* spp) son los más importantes polinizadores en cultivos de invernadero. Su producción comercial ofrece a los productores grandes ventajas económicas y agrícolas. Sin embargo, pueden ser afectados por microorganismos, por lo que un entorno inocuo es indispensable. El polen es el principal alimento para su producción y puede ser una fuente importante de bacterias, virus, protozoarios, hongos y levaduras, que afectan su calidad y transmiten enfermedades a estos insectos. Diversos métodos físicos y químicos se han probado para inactivarlos, pero no han sido efectivos y han afectado su calidad nutricional. El uso de radiación gamma es una alternativa eficiente para inactivar los microorganismos presentes en el alimento. El presente trabajo consistió en determinar el efecto de la radiación gamma sobre microorganismos de importancia sanitaria presentes en alimento (polen procesado) destinado para la crianza masiva del abejorro *Bombus impatiens*. Se probaron dosis de 2, 5, 7 y 9 kGys de radiación y se determinó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), bacterias mesófilas esporuladas (BME), organismos coliformes totales (OCT), hongos, levaduras y la presencia de *Paenibacillus larvae* en alimento proveniente de tres fuentes de origen: Holanda, México y Chile. Se realizó la identificación por métodos moleculares de bacterias con mayor resistencia a la radiación gamma probada. El contenido microbiano fue mayor de 2 log ufc/g en todos grupos microbianos analizados, siendo las BMA las más abundantes (promedio de 4.7 log ufc/g) y el menor contenido fue para los coliformes totales (promedio de 2.6 log ufc/g). Los hongos y los coliformes no fueron detectados en muestras irradiadas a partir de 5 kGy, mientras que las levaduras y las BMA a partir de 7 kGy (<10 ufc/g). El contenido promedio de proteínas (12.95 a 15.46%) y de humedad (26.89 a 30.78%) en el alimento no fue afectado significativamente por la radiación. Las BME fueron las más resistentes a la radiación gamma y fueron identificadas, siendo el género *Bacillus*, el más frecuente en todas las fuentes de polen, representado por catorce especies, seguido por *Paenibacillus* con seis especies. Los resultados sugieren que la radiación gamma es un

tratamiento adecuado para reducir el contenido de microorganismos en el alimento y mejorar su calidad durante la crianza masiva de abejorros.

## ABSTRACT

Bumblebees (*Bombus* spp) are the most important pollinators in greenhouse crops. Commercial rearing offers producers great economic and agricultural advantages. However, in this commercial setting it is essential that the bumblebee population be pathogen-free. Pollen is the main food for its production and could be an important source of bacteria, viruses, protozoa, fungi and yeasts, which can affect their quality and transmit diseases. Physical and chemical methods have been tested to inactivate these pathogens, but they have not been effective and have affected their nutritional quality. The use of gamma radiation is an efficient alternative to reduce or inactivate the microorganisms present in the food. In this work, we determined whether gamma irradiation can minimize the risk of microbiological contamination of bumblebee food. Food samples from three sources of origin: Holland, Mexico and Chile were treated with target doses of 2, 5, 7 and 9 kGy of gamma radiation and then analyzed for composition of aerobic mesophilic bacteria (BMA), sporulated mesophilic bacteria (BME), total coliform organisms (OCT), fungi, yeasts and the presence of *Paenibacillus larvae*. The identification by molecular methods of bacteria with greater resistance to the gamma radiation tested was performed. The microbial content was greater than 2 log cfu/g in all analyzed microbial groups, with BMA being the most abundant (average of 4.7 log cfu/g) and the lowest content was for total coliforms (average of 2.6 log cfu/g) . Fungi and coliforms were not detected in samples irradiated from 5 kGy, while yeast and BMA from 7 kGy (<10 cfu/g). The protein (12.95-15.46%) and moisture (26.89-30.78%) content present in the food was not significantly affected by the radiation. BME were the most resistant to gamma radiation and were identified, being the genus *Bacillus*, the most common in all sources of pollen, represented by fourteen species, followed by *Paenibacillus* with six species. Our results suggest that gamma irradiation is a useful treatment to assure the maintenance of acceptable food quality for bumblebee mass rearing.

## DEDICATORIAS

A Natalia, Alejandro y Erik

Por su paciencia, por su apoyo, por sus sonrisas, por darme la fortaleza para culminar esta meta.

A mis padres,

A mis hermanos,

A Gerardo,

Por su gran apoyo y por todos los momentos compartidos.

Al Dr. Fernández Escartín y a la M. en C. Josefina Saldaña

Por transmitirme ese amor por la Microbiología.

*“La mente es igual que un paracaídas, sólo funciona si se abre”*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Campos Guillén, por su calidad humana y académica, por transmitir sus conocimientos y asesorías, y por ser un gran apoyo en todo momento a lo largo del proyecto.

A mis sinodales, por sus revisiones y comentarios para mejorar el trabajo de tesis.

A la empresa Koppert S.A. de C.V. de México, especialmente al Dr. Alfonso Torres Ruíz y al Dr. Moisés Alejandro Vázquez Cruz, por el interés de colaborar con la UAQ y el financiamiento otorgado para la realización del proyecto.

Al M.S.P. Sergio Pacheco Hernández, y M.I.B. David G. Gutiérrez, por las instalaciones prestadas de la USC para realización de etapa experimental.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química.

A la Dra. Claudia Alvarado del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) por permitirnos el uso del equipo MALDI-TOF- MS para la identificación bacteriana.

A mi gran equipo de trabajo: Vicente Moreno, Silvia Gaytán, Anita G. Estrada e Iván Arvizu, por su gran amistad y apoyo en todas las etapas del trabajo de tesis.

A Caro, Roberto, Yara, Magui, Chava, Samantha, Isaac, Ale, Norma, Lulú y Ceci, compañeros de generación, por los momentos compartidos hasta el final de la maestría.

## INDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. El polen	3
2.1.1 Propiedades nutritivas para el desarrollo de abejas y abejorros	5
2.1.1.1. Nutrientes esenciales	5
2.1.2 Características Físico-Químicas	7
2.1.3. Calidad sanitaria	8
2.1.3.1. Microorganismos indicadores	9
2.1.3.2. Diversidad microbiana	10
2.1.3.3. Criterios microbiológicos	12
2.1.4. Producción	14
2.2. Abejorros	15
2.2.1. Clasificación taxonómica	15
2.2.2. Ciclo de vida	16
2.2.3. Importancia ecológica y económica	17
2.2.4. Principales patógenos de abejorros	18
2.3. Métodos para la inactivación de microorganismos	22
2.3.1. Radiación gamma	23
2.3.1.1. Proceso de radiación gamma	23
2.3.1.2. Aplicaciones	24
2.3.1.3. Ventajas	25
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 General	
4.2 Específicos	



V. METODOLOGÍA	29
5.1 Descripción y toma de muestras	29
5.2 Determinación del contenido microbiano del alimento	29
5.2.1. Tratamiento para germinación de esporas	30
5.2.2. Aislamiento e identificación de <i>Paenibacillus larvae</i>	31
5.2.2.1. Aislamiento e identificación de colonias sospechosas	31
5.2.2.2. Identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
5.3. Determinación del efecto de radiación gamma en el alimento	32
5.3.1. Tratamientos de radiación	32
5.3.2. Efecto en la carga microbiana	32
5.3.3. Efecto de la radiación gamma en el contenido de proteína y humedad	32
5.3.4. Análisis estadístico	33
5.4 Identificación de bacterias con mayor resistencia a la radiación	33
5.4.1. Aislamiento de bacterias resistentes	33
5.4.2. Identificación por técnicas moleculares	33
5.4.2.1. Identificación por MALDI TOF-MS Biotyper®	34
5.4.2.2. Identificación por DNAr 16S	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1. Contenido microbiano en alimento de <i>Bombus impatiens</i>	36
6.2. Determinación del efecto de radiación gamma en microorganismos de interés sanitario presentes en alimento para abejorros	40
6.3. Efecto de la radiación en el contenido de proteína y humedad del alimento	45
6.4. Identificación de microorganismos con mayor resistencia a la exposición de la radiación gamma	46
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. REFERENCIAS	50

## INDICE DE CUADROS

	Página
1. Contenido nutritivo del polen	4
2. Especificaciones Físico-Químicas del polen	7
3. Especificaciones microbiológicas del polen en México	13
4. Especificaciones microbiológicas del polen en Europa	14
5. Clasificación taxonómica de <i>Bombus impatiens</i>	15
6. Principales patógenos de abejorros	19
7. Contenido microbiano en alimento para abejorros proveniente de 3 fuentes de origen	36
8. Efecto de la radiación gamma sobre la población microbiana en alimento para abejorros	41
9. Efecto de la radiación gamma en tres fuentes de origen	41
10. Efecto de la radiación gamma en el contenido de proteína y humedad en el alimento	45
11. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de Holanda	46
12. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de México	47
13. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de Chile	47

## INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Ciclo biológico de <i>Bombus</i>	16
2. Detección de <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR en alimento para <i>Bombus impatiens</i>	39
3. Reducción de la población microbiana en alimento por exposición a la radiación gamma	42
4. Alimento irradiado a 7 y 9 kGys almacenado a 4 <sup>0</sup> C	44

## I. INTRODUCCIÓN

Los abejorros pertenecientes al género *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae), son los más importantes polinizadores en cultivos de invernadero (Meeus y col. 2014; Velthuis y van Doorn, 2006) y para propósitos comerciales, producen mejores resultados que las abejas o la polinización mecánica o manual (Torres y Jones, 2012; Choi y col. 2009). Estos insectos ofrecen grandes ventajas a los productores de cultivos en invernadero, ya que se benefician de la polinización obteniendo menores costos de producción, aumento en el rendimiento y mejor calidad de los frutos (Velthuis y van Doorn, 2006).

Al polinizar las plantas, estos insectos obtienen los nutrientes necesarios para su crecimiento encontrados en el néctar y polen, siendo éste último el que aporta la mayoría de los nutrientes requeridos para el desarrollo fisiológico (Brodschneider y col. 2010). Sin embargo, debido a su origen y durante la producción, el polen se encuentra expuesto a la contaminación con altos niveles de microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos (Yook y col. 1998; Graystock y col. 2016), que pueden afectar su calidad y ser un riesgo potencial en la transmisión de enfermedades (Graystock y col. 2013; Feás y col. 2012). Tanto las larvas como los adultos pueden ser afectados por virus, protozoarios, hongos y bacterias (Forsgren, 2009; Evans y Schwarz, 2011), transmitiendo más de 20 enfermedades a través de su consumo (Medina, 2014).

Entre los principales microorganismos que afectan a los abejorros se encuentra el neogregarino *Apicystis bombi*, el protozoario *Crithidia bombi*, el hongo *Nosema bombi*, el ácaro *Locustacarus buchneri* (Sachman-Ruiz y col., 2015), el virus de alas deformadas (DWV) (Goulson y Hughes, 2015; Meeus y col. 2014), entre otros; además pueden ser reservorios de otros virus que se han asociado con el desorden del colapso de colonias en abejas melíferas (Sachman-Ruiz y col. 2015) y de esporas de la bacteria *Paenibacillus larvae*, que causa la enfermedad Loque Americana o American Foulbrood (AFB) en larvas de abejas (Forsgren, 2009; Dobbelaere y col. 2001).

En México, es producida y comercializada la especie *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), la cual es nativa del noroeste de América y es un eficiente polinizador. Su principal alimento es el polen, no obstante, existe poca información acerca de su calidad microbiológica (Velthuis y van Doorn, 2006).

Un control sanitario y prevención de enfermedades a lo largo de la producción de los abejorros es indispensable. Aunque el acceso de diversas fuentes de contaminación en los ambientes cerrados donde se crían es más controlado, el ingreso de polen contaminado es posible (Pridal y col. 1997), por lo que deben realizarse acciones correctivas para su descontaminación. Diversos métodos físicos y químicos han sido probados para inactivar los microorganismos presentes en el polen, resultando ser muy agresivos, disminuyendo su calidad nutricional, demostrando bajos efectos letales y altos costos (De Guzman y col. 2011). La radiación gamma, es una alternativa para disminuir los niveles de contaminación sin afectar las características nutricionales del polen (Dobbelaere y col. 2001; Yook y col. 1998), sin embargo, los datos publicados sobre la eficacia de este tratamiento son limitados (Graystock y col. 2016). Por lo tanto, es importante generar estudios que permitan conocer la dosis de radiación más efectiva para la reducción de microorganismos sin afectar sus propiedades fisicoquímicas del polen.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 POLEN

El polen (*Pollinis*) es el gameto masculino de las flores. Por medio de la polinización se transfiere al estigma de una flor hasta el saco embrionario de las flores, donde el óvulo es fertilizado con una célula espermática del polen para producir un embrión, que da lugar a la producción de semillas y frutos (Aprol, 2012).

Es un producto natural compuesto por polen de flores que las abejas recolectan, lo almacenan y posteriormente lo mezclan con capas delgadas de miel y enzimas presentes en las secreciones salivares, formando los gránulos que son colocados en el panal (Bárbara y col. 2015). El tamaño de los granos de polen varía de 2.5 a 250  $\mu\text{m}$ . Está rodeado por una pared celular de doble capa, llamadas intina y exina; ésta última tiene una gran resistencia a los factores fisicoquímicos y en su superficie existen numerosos poros y surcos, así como una capa de bálsamo que facilita la adherencia del polen al abdomen de las abejas (Komosinska-Vassev y col. 2015).

Es reconocido por su alto contenido y calidad nutritiva (Cuadro 1), ya que aporta energía y proteínas de alta calidad. Contiene entre 13 y 30 % de proteínas que incluyen a 22 aminoácidos entre los que se encuentran la prolina, leucina, valina, tirosina, serina, lisina, el ácido aspártico, el triptófano, entre otros; 21 a 55 % de carbohidratos como fructuosa, glucosa, sacarosa, trehalosa, entre otros; 1 al 20 % son lípidos entre ellos el omega 3 y 6; además de vitaminas como tiamina ( $B_1$ ), riboflavina ( $B_2$ ), ácido ascórbico y minerales como potasio, fósforo, calcio, magnesio, hierro, cobre (Estevinho y col. 2012, SAGARPA y col. 2002; Serra y Jordá, 1997). También es rico en carotenoides, flavonoides, fitoesteroles y contiene enzimas y coenzimas. (Roulston y Cane, 2000; Bárbara y col. 2015). Se le reconocen valiosas propiedades biológicas, entre ellas: antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias, antimutagénicas, antioxidantes, antialérgicas, antivirales, anticarcinogénicas, hipolipemiantes, hipoglucemiantes e

inmunoestimulantes que tienen beneficios a la salud y por tanto, es sugerido su uso como suplemento diario (Komosinska-Vassev y col. 2015).

**Cuadro 1. Contenido nutritivo del polen**

Componentes	Contenido
	Mínimo-Máximo
	g/100g
Carbohidratos	13 – 55
Fibra	0.3 – 20
Proteína	10 – 40
Lípidos	1 – 10
	mg/100g
Minerales	500 -3000
Vitaminas	20 – 100
Flavonoides	40 – 3000

Bárbara y col. 2015; DeGrandy-Hoffman, 2010; Evans, 2011

Además de su uso para el consumo humano, su utilización (granos o extracto de etanol) en la medicina tradicional y complementaria para el tratamiento de resfriados, gripas, úlceras, anemia, colitis, enteritis, adhesión intra-abdominal post-operatoria, etc. (Cardoso y Silva, 2016), se emplea en la elaboración de cosméticos (Bárbara y col. 2015; Yook y col. 1998); se han realizado diversos estudios que comprueban los beneficios del polen, por ejemplo, su uso en la dieta de la tilapia mejoró la tasa de crecimiento e incrementó la protección inmunitaria contra infecciones causadas por *Aeromonas hydrophila*; mejoró el desarrollo de órganos digestivos de pollos en engorda sugiriendo a los investigadores que el uso del polen puede ser usado como suplemento alimenticio para síndromes como el de intestino corto (Cardoso y Silva, 2016).

### **2.1.1. Propiedades nutritivas importantes para el desarrollo de las abejas y abejorros.**

El polen es un alimento esencial para las abejas y abejorros. Es la principal fuente de proteínas, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales (Estevinho y *col.* 2011). El desarrollo y supervivencia de las colonias de abejas y abejorros está estrechamente relacionada con la disponibilidad de tales nutrientes (Keller y *col.* 2005). Además de influir en la longevidad de los individuos, el polen es importante a nivel de la colonia, ya que permite la producción de la jalea real por las obreras, que es usada para alimentar a las larvas (Crailsheim, 2010). Por lo tanto, una consecuencia directa de la deficiencia nutricional es una disminución en la población de la colonia y una salud deficiente de los individuos, lo cual puede afectar también la capacidad de los individuos para resistir ciertos tipos de estrés (patógenos y plaguicidas) (Le Conte y *col.* 2011). Por esto, el estudio de la influencia de su consumo requiere tomar en cuenta la calidad y la diversidad de las fuentes. A pesar de que algunos estudios han mostrado que la calidad del polen puede afectar la longevidad y el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas de estos insectos, y que la diversidad del polen puede mejorar algunas respuestas inmunológicas, el conocimiento de la influencia de la calidad y diversidad del polen es aún limitado (Pernal y Currie, 2000).

#### **2.1.1.1. Nutrientes esenciales.**

Las proteínas juegan el papel más importante en el desarrollo de las abejas (Cohen, 2003). La longevidad de estos organismos, cría de progenie y producción de miel se reducen de manera importante cuando la disponibilidad de proteína no es la adecuada (DeGrandi-Hoffman y *col.* 2010; Herbert, 2000). Su deficiencia también afecta la habilidad de las abejas para resistir enfermedades (Matilla y Otis, 2006). Se cree que lo anterior es un factor importante involucrado en el “desorden de colapso de colonias” (Cox-Foster y *col.* 2007).

Se requieren proteínas de alta calidad y una composición definida de aminoácidos para el óptimo crecimiento de los individuos y para el correcto



desarrollo de las glándulas hipofaríngeas de las obreras nodrizas, estas glándulas son necesarias para producir el alimento para las larvas (Crailsheim y Stolberg, 1989). Si las nodrizas no obtienen polen o alguna otra fuente apropiada de proteína, sus secreciones no resultarán adecuadas para promover el crecimiento y desarrollo normal de las larvas y la producción de huevos de la reina. Cuando su labor como nodrizas termina, normalmente a los 10-14 días de edad, y las labores como obreras comienzan, los requerimientos de proteína disminuyen y su principal dieta se vuelve a base de carbohidratos obtenidos del néctar y la miel (DeGrandi-Hoffman y col. 2010).

La composición de aminoácidos determina la cantidad de polen requerido por las abejas más que el contenido de proteína. Un desempeño pobre en el desarrollo de la colonia puede ser causado por niveles inadecuados de varios aminoácidos (Loper y Cohen, 1987). Polen de especies de *Eucalyptus* colectado por abejas contiene una concentración de proteínas de  $24.9 \pm 0.6\%$  en base seca, pero normalmente es deficiente en isoleucina, lo cual sugiere que las abejas no pueden adaptarse bien a una dieta exclusiva de polen de *Eucalyptus* (Somerville y Nicol, 2006).

En abejas, los azúcares en los alimentos parecen actuar como fagoestimulantes. La jalea real con la que se alimenta a las larvas de reina contiene cerca de 12% de azúcares en los primeros días de su desarrollo, mientras que la jalea para obreras sólo contiene un 4% de azúcares. Los adultos pueden utilizar monosacáridos tales como la glucosa, fructosa, sacarosa, trehalosa, maltosa y melezitosa. Pero son incapaces de metabolizar galactosa, manosa, lactosa, rafinosa, dextrina, inulina, ramnosa, xilosa y arabinosa. Los azúcares de caña y remolacha son sustitutos aceptables; las abejas pueden utilizar algunos frutos como fuente de carbohidratos (Roulston y Cane, 2000).

Los lípidos (ácidos grasos omega 3 y omega 6, esteroides y grasas) son usados como fuente de energía para larvas e individuos jóvenes y para la síntesis de reservas de grasa y glucógeno (Estevinho y col. 2011).

## 2.1.2. Características Físico-Químicas

El conocimiento de las propiedades nutritivas del polen, lo ha convertido en un producto de amplia demanda en el mercado, por lo que es importante que exista un buen método de producción, para mantener sus características físico-químicas y generar un producto de alta calidad (Bogdanov, 2004).

El polen es clasificado por su tipo, presentación y coloración. La presentación comercial es en forma granular o en polvo y su coloración es monocolor o multicolor. Las variaciones en el color de estos productos se deben principalmente al origen de las flores, el clima y efectos del calor en el almacenamiento (Komosinska-Vassev y *col.* 2015).

El polen debe cumplir con las siguientes especificaciones sensoriales:

- Olor característico de las especies florales de que provenga.
- Exento de olor a rancidez.
- Color característico. De acuerdo a su origen botánico puede presentar las siguientes coloraciones: blanco, negro, amarillo, naranja, rojo, verde y violeta
- El sabor puede ir de un dulce a ácido en diferentes grados.
- Exento de material extraño distinto al polen como restos de vegetales, abejas u otros insectos o parásitos, larvas, piedras, metales, excretas de insectos y roedores (NMX-FF-094-SCFI-2008).

De acuerdo a sus características físico-químicas, el polen debe cumplir con las especificaciones establecidas en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Especificaciones Físico-Químicas del polen**

Parámetros	Valor mínimo	Valor máximo	Métodos de prueba
Humedad (%)	4.5	8	NOM-116-SSA1-1994
Cenizas (%)	1.5	2.2	NMX-Y-093-SCFI-2003
Proteína (%)	12	18	NMX-F-608-NORMEX-2011
Grasa (%)	2.5	6.5	NMX-F-615-NORMEX-2004
Fibra (%)	0.27	0.70	NMX-Y-094-SCFI-2012
pH	4	-	NMX-F-317-NORMEX-2013

(NMX-FF-094-SCFI-2008)

El contenido de agua, es un parámetro muy importante para mantener una buena calidad, el cual no debe ser mayor de 6%. Si la humedad excede, el polen puede fermentarse y provocar un sabor desagradable (Bogdanov, 2004).

Para evitar su deterioro, el polen debe ser cosechado diariamente y secado. El secado puede realizarse en hornos convencionales a no más de 40°C hasta lograr el 6% o menos de humedad. Posteriormente, almacenarlo en congelación. A los 2 días bajo esta condición, los insectos plaga presentes morirán. También puede ser almacenado bajo nitrógeno líquido o liofilizado, lo cual permitirá la preservación óptima de las propiedades biológicas y nutritivas, evitando la oxidación y conservando de manera óptima la actividad enzimática, necesaria para los efectos nutricionales de la flora intestinal (Cardoso y Silva, 2016).

### **2.1.3. Calidad sanitaria**

Un alimento de buena calidad sanitaria debe incluir los siguientes atributos: nutritivo, idóneo, fresco, sensorialmente aceptable, inocuo y larga vida de anaquel que deben procurarse desde su generación hasta su consumo. La falta de estos atributos conduce a una deficiente calidad sanitaria, traduciéndose en daños de variada naturaleza, entre ellos, la presentación de enfermedades, pérdidas económicas por deterioro y, causa de muerte de las poblaciones implicadas (Fernández, 2008).

La presencia de plaguicidas en el polen, pone en riesgo la salud de los insectos polinizadores. Los residuos de estos compuestos incluyen a acaricidas, ácidos orgánicos, insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas. Se han encontrado hasta 150 plaguicidas diferentes en colmenas (Mullin y *col.* 2010), los cuales provocan múltiples efectos que son derivados de una combinación de la toxicidad y el nivel de exposición, afectando sus funciones fisiológicas como la reproducción y la longevidad, causando desorientación y fracaso para regresar a la colmena, disminuyendo su salud, debilitando las colmenas y finalmente causándoles la muerte. La exposición a los plaguicidas puede afectar tanto los mecanismos de desintoxicación como la respuesta inmune, lo que hace que las

abejas sean más susceptibles a microorganismos patógenos que pueden provenir de diversa fuentes, entre ellas el polen (Goulson y col. 2015).

El contenido y tipo de microorganismos pueden influir en la calidad del polen. Se encuentran presentes bacterias, virus, protozoarios, hongos y levaduras (Graystock y col. 2016; Goulson y Hughes, 2015; Belhadj y col. 2014; García-García y col. 2006), que provienen de las abejas recolectoras, de la miel, del néctar o de fuentes externas como el agua, el aire, el suelo, la manipulación humana, los equipos y recipientes mal saneados, entre otras. Su consumo generalmente es de manera directa y sin ningún tipo de tratamiento que pueda disminuir eficazmente la población microbiana, de tal manera que si la recolección, el almacenamiento y la comercialización no son apropiadas, el desarrollo de microorganismos con potencial patógeno o deteriorador es posible (González y col. 2005; Multinelli y Baggio, 2008).

#### **2.1.3.1. Microorganismos indicadores**

Los microorganismos de interés sanitario incluyen a grupos que son causantes de deterioro y agentes etiológicos de enfermedades asociadas al consumo de los alimentos. Su elevado contenido expresa una imagen negativa de su calidad microbiológica y sugiere la necesidad de revisar las condiciones sanitarias durante su obtención y manejo. Entre ellos se encuentran las bacterias mesófilas aeróbicas (BMA), un grupo muy heterogéneo, que desarrolla a temperaturas entre 22-37°C en presencia de oxígeno. Una elevada carga de BMA pone de manifiesto la exposición a diversas fuentes de contaminación (suelo, agua, aire, equipo y utensilios mal saneados), inadecuadas condiciones de almacenamiento, prácticas higiénicas deficientes o nulas, entre otras (Fernández, 2008).

Las bacterias esporuladas, son bacilos ampliamente distribuidos en la naturaleza que tienen la capacidad de formar esporas altamente resistentes al calor y a los agentes químicos e incluyen especies con capacidad patógena tanto en humanos (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*) como en

abejas (*Paenibacillus larvae*) (Chagas y col. 2012). Diversas especies participan en el deterioro y su presencia en concentraciones elevadas indica la exposición al medio ambiente y falta de higiene en áreas y equipo (Jensen, 2012).

Los coliformes son un grupo de bacterias no esporuladas, bacilos gram negativos que fermentan la lactosa a 35°C dentro de las primeras 48 h de incubación. Los géneros más prominentes incluyen a *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Son indicadores de operaciones sanitarias objetables, exposición al medio ambiente, calidad sanitaria en el agua y pueden causar deterioro en diversos alimentos. (Fernández, 2008; Feng y col. 2002).

La presencia de hongos y levaduras en los alimentos se asocia a una exposición de fuentes de contaminación y falta de frescura. Las levaduras tienen capacidad para deteriorar (turbiedad, gasificación, malos olores, cambios de color, mucosidad); los hongos, generan un aspecto indeseable y tienen potencial tóxico (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*) para el hombre (Fernández, 2008), y son causa de enfermedades (*Nosema bombi*, *Ascosphaera apis*) para abejas y abejorros (Aronstein y Murray, 2009; Goulson y Hughes, 2015).

El contenido de BMA, coliformes totales, coliformes fecales, bacterias lácticas, hongos y levaduras, así como la presencia de bacterias que se utilizan como indicadores de contaminación ambiental o humana como *Streptococcus* “D” de Lancefield, *Bacillus*, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus* han sido reportados y utilizados para conocer la calidad sanitaria del polen (Bárbara y col. 2015; Serra y Escolá, 1997; Feás y col. 2012; Estevinho y col. 2012; Puig-Peña y col. 2012).

### **2.1.3.2. Diversidad microbiana en polen**

A finales de la década de los 50`s, se aislaron las primeras bacterias de polen tales como *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, además de algunas levaduras. En 1966 se reportaron los géneros *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Saccharomyces* asociados al polen en condiciones de almacenamiento. Gilliam (1979), reportó la presencia de levaduras y bacterias del

género *Bacillus*: *B. subtilis* fue aislada de muestras de polen tomadas directamente de las flores, mientras que *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. circulans* de polen almacenado. Pridal y colaboradores (1997), aislaron *B. circulans*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus pabuli*, *Ascosphaera apis*, *Flavimonas (Pseudomonas) oryzihabitans* y *Pantoea agglomerans* de polen colectado directamente de trampas. La carga microbiana de polen joven y maduro colectado de colmenas incluye a *Yersinia* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Lactobacillus* sp., y de polen corbicular a *Pseudomonas* sp. y *Streptococcus* sp. (García-García y col. 2006). *Serratia marcescens* (Brindza y col. 2010), *Proteus mirabilis*, *Citrobacter diversus*, *Providencia* sp., *Enterobacter cloacae* (Belhadj y col. 2014), *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, aisladas de alimentos derivados de abejas y polen comercializado y almacenado (Belhadj y col. 2014; Serra y Escolà, 1997).

El intestino de las abejas contiene 1% de levaduras, 27% de bacterias gram positivas como *Bacillus*, *Bacteridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y 70% de gram negativas como *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Pseudomonas* (Al-Waili y col. 2012), las cuales aportan beneficios a las abejas, ya que algunas participan en la digestión de los componentes del polen y otras como *Pseudomonas* contribuyen al rompimiento de la pared del grano de polen (Pain y Maugenet, 1966).

*Paenibacillus larvae* ha sido aislada de polen (Chagas y col. 2012). Esta bacteria es la causante de la enfermedad American Foulbrood (AFB) o loque americana que afecta a las larvas de abejas (Genersch y col. 2006). El germen no afecta a los abejorros, sin embargo, la enfermedad es considerada de las más perjudiciales a nivel mundial y causa grandes pérdidas económicas a los apicultores, con una estimación de 5 millones de dólares anuales (Medina, 2014). Su detección en el polen ha sido de interés para que sea considerada dentro de este estudio. *P. larvae*, es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, productor de esporas. Las esporas son altamente resistentes a la desecación, a

temperaturas altas, a la exposición de rayos UV y también sobreviven al contacto de desinfectantes (Alippi, 1999; De Guzman y col. 2011). Pueden permanecer viables por varios años en diversos equipos utilizados para la apicultura, lo que permite que la enfermedad sea altamente contagiosa. Las esporas son la única forma infecciosa, las abejas adultas no se infectan al ingerirlas pero pueden permanecer en el tracto digestivo por más de dos meses y ser vectores del patógeno. En muchos países AFB es una enfermedad de declaración obligatoria y las medidas están reguladas por las leyes correspondientes. Se encuentra ampliamente difundida en todos los países productores de miel. Está presente en México y fue introducida con la importación de abejas reinas de E.U. al estado de Puebla en 1932 (Medina, 2014).

La microbiota presente en polen empacado destinado para consumo humano, incluye a *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria alternata*, *Rhizopus* spp., *Mucor hiemalis*, *Botrytis* spp., *Epicoccum* spp., y diversas levaduras (Belhadj y col. 2014; García-García y col. 2006; González y col. 2005). La mayoría de ellos tienen capacidad de producir micotoxinas, las cuales causan intoxicaciones agudas y crónicas con efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, neurotóxicos y nefrotóxicos en humanos (Refai y col. 1996; FAO, 2000). *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* y *N. bombi*, son hongos patógenos de abejorros presentes en polen (Goulson y Hughes, 2015; Higes y col. 2008; Aronstein y Murray, 2010).

### **2.1.3.3. Criterios microbiológicos**

Los criterios microbiológicos o normas microbiológicas, consisten en el establecimiento de límites de tolerancia de grupos seleccionados de microorganismos en los alimentos. Tales criterios permiten tener una regulación sanitaria y protección del consumidor así como ser una evidencia del cumplimiento de las disposiciones sanitarias que deben ser efectuadas (Fernández, 2008). Las normas existentes van dirigidas para polen destinado al consumo humano, no

existen por lo tanto, para el consumo de abejas y abejorros; sin embargo, es la única herramienta con la que se cuenta para evaluar la calidad microbiológica de este producto utilizado para la alimentación de los insectos.

De acuerdo a la normatividad en México (SAGARPA, 2015; NMX-FF-094-SSFI-2008), Brasil (APACAME, 2000), Cuba (Normas NC), Argentina (CAA), Perú (NTS No 071-MINSA/DIGESA-V.0) y Unión Europea se han establecido especificaciones mínimas de calidad microbiana para la producción y comercialización de polen. En México, las especificaciones microbiológicas se muestran en el cuadro 3, las cuales son destinadas para consumo humano.

**Cuadro 3. Especificaciones microbiológicas del polen en México**

<b>Microorganismo</b>	<b>Valor Máximo</b>	<b>Método de Prueba</b>
Bacterias Mesófilas Aerobias (ufc/g)	10,000	NOM-092-SSA1-1994
Hongos y Levaduras (ufc/g)	300	NOM-111-SSA1-1994
Coliformes	Ausente	NOM-113-SSA1-1994
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	NOM-210-SSA1-2014
<i>Salmonella</i>	Ausente	NOM-210-SSA1-2014
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	NOM-210-SSA1-2014

(NMX-FF-094-SCFI-2008)

Los criterios microbianos de mostrados en los cuadros 3 y 4 están basados en la detección (presencia/ausencia) de bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium* spp., *S. aureus* e incluyen el contenido máximo permisible de microorganismos indicadores tales como bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, *E. coli*, hongos y levaduras, grupos importantes para la determinación de la calidad del polen. Las normas microbiológicas de Brasil, incluyen al patógeno de abejas *P. larvae* (Chagas y col. 2012; APHA 1992), sin embargo, al igual que México, las especificaciones en Europa (Cuadro 4) no incluyen a ningún patógeno para abejas y abejorros. Argentina, Brasil, Bulgaria, Polonia, Suiza, son países que han establecido estándares de calidad oficiales en polen de abeja, mientras que otros países, como Portugal no cuenta con una legislación de los parámetros fisicoquímicos y sanitarios del polen. Para permitir el uso del polen en aplicaciones dietéticas y terapéuticas, su calidad debe ser



monitoreada rigurosa y profundamente (Estevinho y col. 2012) (Campos y col. 2008).

#### Cuadro 4. Especificaciones microbiológicas de polen en Europa

Microorganismo	Valor Máximo
Bacterias Mesófilas Aerobias	< 100,000/g
Hongos y Levaduras	< 50,000/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	100/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente/g
<i>Salmonella</i>	Ausente/10g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente/1g

(Campos y col. 2008)

#### 2.1.4. Producción

La producción mundial de polen es de alrededor de 1500 toneladas por año. España es actualmente el mayor productor, seguido por China, Australia y Argentina (Estevinho y col. 2011). En México, para el año 2008, la producción se ubicó alrededor de 25 toneladas. La comercialización de polen de producción nacional resiente una fuerte competencia con producto importado de China y en menor proporción de España (SAGARPA y PNPCAA, 2010).

Las mejores zonas para la producción de polen en México son las tropicales, como las costas del golfo, desde Tamaulipas hasta Yucatán, y del pacífico desde Sinaloa hasta Chiapas, la península de Yucatán, con los tres estados que la conforman. En la región centro también se encuentran algunas áreas con buena producción de polen, donde se encuentran las jaras, huizaches, mezquites, cultivo de maíz, entre otras; en el norte del país algunas plantas productoras de polen como las cactáceas, el palo verde, mezquite, huizache y varios tipos de palmeras (Manual de BPP, 2015).

Cuando la naturaleza está abundante de polen, las abejas colectan entre 15 y 55 kg anualmente y durante un período muy activo de acarreo, pueden llevar hacia la colmena de medio a un kilogramo de granos de polen por día. La cosecha es

realizada con colectores o rejillas diseñadas para su recolección, instaladas en la entrada de la colmena, las cuales permiten el ingreso de las abejas, pero son suficientemente estrechas para retener el polen, logrando su desprendimiento de las patas. La colecta no debe excederse más de dos semanas para evitar el debilitamiento de la colmena. Una vez colectado, los granos de polen son limpiados con aire purificado, secados y almacenado hasta su comercialización. (Cardoso y Silva, 2016).

## 2.2. ABEJORROS (*Bombus*)

### 2.2.1. Clasificación taxonómica de *Bombus impatiens*

Los abejorros, son insectos pertenecientes al género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae), el cual incluye a 50 subgéneros y 250 especies (Goulson, 2003), de las cuales 43 se encuentran desde México hasta el Centro y Sur de América. Dentro de éstas, 21 especies han sido registradas en México (Torres y col. 2013). La clasificación taxonómica de *B. impatiens*, especie de interés en este estudio, se muestra en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Bombus impatiens***

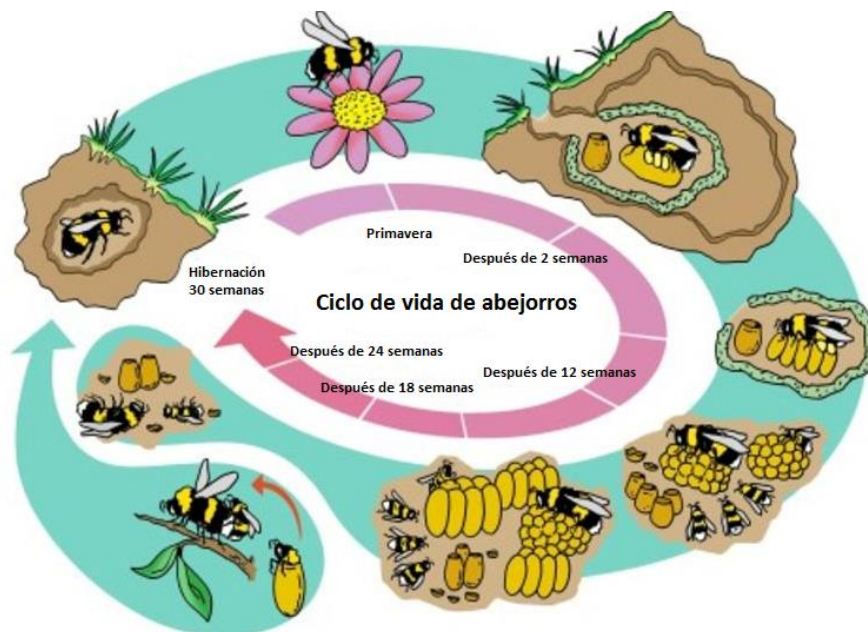
Dominio	Eucarya
Reino	Animalia
Phyllum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Hymenoptera
Suborden	Apocrita
Familia	Apidae
Tribu	Bombini
Género	<i>Bombus</i>
Especie	<i>Impatiens</i>

(Michener, 2000)

### 2.2.2. Ciclo de vida

Los abejorros son insectos eusociales, ya que tienen un gran nivel de organización social. Presentan cooperación en el cuidado de las crías y división de trabajo entre las castas. Tienen un ciclo biológico anual (Figura 1), donde la reproducción está a cargo de la reina. Al iniciar la colonia, la reina recolecta suficiente alimento (forrajeo) para mantener a la futura descendencia, busca un sitio para anidar y se encarga de fabricar las celdas donde deposita los huevecillos (Goulson, 2003). Aproximadamente 2 semanas después, los huevos se convierten en larvas. La reina, y posteriormente las obreras de una generación anterior, alimentan a las larvas con polen y néctar, siendo las obreras las encargadas de coleccionar el alimento. La colonia crece rápidamente y comienza a producir reinas jóvenes y machos. Las reinas jóvenes se aparean e hibernan. La colonia fundadora muere (8-12 semanas después) (Natupol, 2017).

**Figura 1. Ciclo biológico de *Bombus***



(Natupol, 2017)

### 2.2.3. Importancia ecológica y económica

El valor potencial de los insectos polinizadores en la agricultura ha sido reconocido por mucho tiempo, proporcionando un servicio de polinización mundial estimado en \$ 215 billones anuales. México es un país con alta diversidad de especies vegetales cultivadas. El 75% de las especies de plantas que producen frutas y/o semillas para consumo humano, dependen de insectos polinizadores para una producción eficiente (Torres y col. 2013), siendo las abejas y los abejorros los de mayor importancia. Sin embargo, las poblaciones silvestres han disminuido drásticamente (Goulson y Hughes, 2015; Anderson y col. 2011). Las causas incluyen la elevada tasa de deforestación, el uso intensivo de agroquímicos y plaguicidas para el control de plagas en monocultivos extensivos (Torres-Ruiz y col. 2013; Meeus y col. 2010) y las enfermedades causadas por microorganismos patógenos (Graystock y col. 2016). Debido a esto, nuevas tecnologías han sido implementadas para su crianza en ambientes protegidos lo que ha permitido la domesticación de algunas especies (Goulson y Hughes, 2015). El más conocido polinizador manejado es la abeja *Apis mellifera*. No obstante, los abejorros son altamente eficientes en la polinización de diversos cultivos, debido a que sus lenguas son más largas que las de las abejas melíferas, lo que permite polinizar flores con corolas profundas (Velthuis y van Door, 2006), realizan vibraciones al momento de visitar una flor, sus cuerpos son mas grandes y con numerosas vellosidades, resisten temperaturas mas bajas, etc. Actualmente más de un millón de colonias son producidas y exportadas a escala global anualmente. Sus ventas son destinadas para la polinización de una amplia variedad de cultivos de frutas y verduras desarrollados tanto en invernadero como en campo abierto (Goulson y Hughes, 2015), principalmente para la producción de jitomate (*Solanum lycopersicum*) en invernadero, ya que estos cultivos requieren polinización complementaria para el llenado de frutos y anteriormente eran polinizados mediante vibración mecánica, lo cual era muy laborioso y costoso. Sus flores requieren de vibraciones para liberar el polen y fertilizar los ovarios (Harder y Barclay, 1994).

En Europa, colonias de *B. terrestris* criadas mediante métodos masivos han sido utilizadas en invernaderos de jitomate desde 1987 y han reemplazado en consecuencia la polinización manual, su uso de este abejorro resultó en frutos de mayor peso comparados con la polinización manual (Heemert y col. 1990). En México, el abejorro *B. impatiens* ha sido usado desde 1994 para la polinización del jitomate (Winter y col. 2006).

En Norteamérica, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y SAGARPA en México restringieron la importación de especies Europeas de abejorros. Para proveer polinizadores al mercado del jitomate, México ha importado nidos de *B. impatiens* de EUA y Canadá desde 1995. Entre 2005 y 2009 más de 128,000 reinas y pequeñas colonias de *B. impatiens* fueron importadas a México por dos compañías para su venta (Campuzano-Hernández, 2010).

#### **2.2.4. Principales patógenos de abejorros**

Los abejorros son altamente sociales, frecuentan una multitud de nichos ambientales, y comparten continuamente alimentos, condiciones que promueven la transmisión de microorganismos patógenos. Aunado a esto, los abejorros manejados sufren de estrés por el hacinamiento, por el transporte a largas distancias y también se exponen a productos químicos agrícolas dispersados en los invernaderos, lo que aumenta la susceptibilidad a las enfermedades (Anderson y col. 2011; Sachman-Ruiz y col. 2015).

Las enfermedades infecciosas emergentes se reconocen cada vez más como un potencial importante del declive del abejorro (Arbetman y col. 2012; Sachman-Ruiz y col. 2015), lo que causa gran preocupación por la pérdida de servicios de polinización para cultivos agrícolas y plantas silvestres (Koch y Schmid-Hempel, 2011).

Los polinizadores criados masivamente, son desarrollados en ambientes cerrados y controlados, siendo el polen su principal alimento. Sin embargo, debido a su origen y exposición al medio ambiente, el polen presenta una gran diversidad microbiológica, incluyendo virus, ácaros, hongos, parásitos y bacterias (Forsgren,

2009; Evans y Schwarz, 2011). De éstos, destacan patógenos de abejorros que transmiten más de 20 enfermedades (Medina, 2014). Dentro de las enfermedades de mayor importancia ecológica y económica que afectan tanto a las larvas como a los adultos destacan las mostradas en el cuadro 6. Los abejorros, pueden ser susceptibles a dichas enfermedades donde además de afectar su salud, algunos pueden ser hospederos de diversos patógenos y transmitirlos a congéneres silvestres cuando escapan de los invernaderos (Arbetman y col. 2012).

El uso de *B. impatiens* es adecuado en invernaderos porque es una especie adaptada a condiciones ambientales más extremas que otros himenópteros y es un polinizador muy eficiente. Sin embargo, este abejorro también puede ser hospedero de diversos virus que se han asociado con el desorden del colapso de la colonia en abejas melíferas, así como también de una serie de patógenos específicos del abejorro (Sachman-Ruiz y col. 2015).

**Cuadro 6. Principales patógenos de abejorros**

Patógeno	Detección en insecto	Enfermedad
<i>Apicystis bombi</i>	Túbulos de Malpighi y tejido graso	Afectaciones neurológicas
<i>Crithidia bombi</i>	Túbulos de Malpighi y tejido intestinal	Bajo rendimiento reproductivo
<i>Locustacarus buchneri</i>	Espiráculos y sacos aéreos	Alteración de la conducta
<i>Nosema bombi</i>	Intestino y túbulos de Malpighi	Nosemosis
<i>Sphaerularia bombi</i>	Abdomen	Afecta reproducción y comportamiento de forrajeo
Virus DWV	Alas	Alas deformadas

(Goulson y Hughes, 2015; Medina, 2014; Graystock y col. 2014; Sachman-Ruiz y col. 2015)

Entre las enfermedades emergentes del abejorro, el neogregarino *Apicystis bombi* cuenta con un gran potencial de propagación debido a su alta virulencia y su capacidad para infectar colonias comerciales (Arbetman y col. 2012). Parasita abejorros adultos. Su transmisión es vía fecal-oral (Goulson y Hughes, 2015). Causa graves alteraciones físicas como la degradación del tejido adiposo, y alteraciones neurológicas con efectos en el comportamiento provocando

disminución en el establecimiento de las colonias, conflictos de comunicación entre la reina y las obreras, y aumentando la mortalidad de las obreras (Plischuk y col. 2011). Tiene una distribución cosmopolita. Se ha registrado en poblaciones silvestres de más de 20 especies de abejorros en Europa y América del Norte y en colonias comerciales de *B. terrestris* importadas en Irlanda y Turquía. El patógeno también fue detectado en 32 colonias de *B. impatiens* (obreras) colectados de 120 invernaderos del centro de México (Sachman-Ruiz y col. 2015).

*Crithidia bombi* es un parásito con un ciclo de vida que ocurre sólo en insectos. Se encuentra ampliamente distribuido, con prevalencias de entre 10% y 30% afectando a abejorros adultos. Su transmisión es vía fecal-oral, no requiere ningún vector. Parece incapaz de infectar a las abejas (Goulson y Hughes, 2015). Es un parásito importante por su alta virulencia ya que tiene efectos letales en las reinas que están a punto de iniciar sus colonias. La infección reduce el rendimiento reproductivo hasta un 40-50% en comparación con las reinas saludables (Koch y Schmid-Hempel, 2011) y reduce la supervivencia de las obreras hasta un 50% cuando los alimentos son escasos. En obreras de *B. impatiens* afectadas, obtienen una menor eficiencia de forrajeo. Este efecto es importante, ya que los abejorros son polinizadores clave tanto en ambientes comerciales como naturales (Sachman-Ruiz y col. 2015). Las infecciones ocurren a través del contacto de abejorros con nidos infectados, o con materiales de colmenas o flores que han sido visitadas previamente por un abejorro infectado. La propagación a especies silvestres puede darse debido al uso creciente de abejorros comerciales (Schmid-Hempel y Tognazzo, 2010; Goulson y Hughes, 2015), como fue demostrado por Plischuk y col. (2017) en un estudio realizado en la región noroeste de la Patagonia, donde se registró la presencia de *C. bombi* asociado a *B. terrestris*, mostrando una prevalencia de 2% - 21.6% a lo largo de siete años. El patógeno también fue detectado en 12 colonias de *B. impatiens* (obreras) colectados de 120 invernaderos del centro de México (Sachman-Ruiz y col. 2015).

*Nosema bombi* es un hongo que afecta a abejorros adultos. Su transmisión es vía fecal-oral, reduciendo la supervivencia de las obreras y la capacidad de la colonia (Goulson y Hughes, 2015). El microsporidio presenta dos estados en su

ciclo de vida: como espora y como célula vegetativa. Su transmisión es a través de la ingestión de alimento contaminado con esporas. Una vez ingeridas, éstas germinan e invaden las células epiteliales del intestino medio donde se multiplican y genera nuevas esporas infecciosas, de las cuales se producen alrededor de 10 a 50 millones, que son liberadas a través de las heces, o bien, puede ocurrir una germinación intracelular provocando una infección sistémica y muerte del insecto (Evans y col. 2011, Medina, 2014). Presenta una alta dispersión a través de abejorros comerciales, los cuales fueron implicados en la muerte de abejorros silvestres en América del Norte (Goulson y Hughes, 2015). La prevalencia del patógeno ha aumentado significativamente en poblaciones silvestres que se encuentran cercanas a invernaderos comerciales. En 1998, se registró un brote de *N. bombi* en instalaciones de producción de abejorros en América del Norte. Se cree que fue debido a la importación de colonias europeas infectadas de *B. terrestris* a México en los años de 1995 y 1996 (Goulson y col. 2008).

*Locustacarus buchneri* es un ácaro que parasita las tráqueas y sacos de aire de los abejorros (larvas, pupas y adultos) y se alimenta de la hemolinfa de los adultos. Puede causar letargo, alteración de la conducta de forrajeo y reducción de vida; Goulson y Hughes, 2015; Yoneda y col. 2008; Otterstatter y Whidden, 2004). Tiene una distribución mundial. La propagación ha ocurrido desde abejorros comerciales (*B. terrestris*) hacia abejorros silvestres en Japón (Goulson y Hughes, 2015; Murray y col. 2013) y afecta al menos a 25 especies de abejorros en la región Holártica (Otterstatter y Whidden, 2004). Una colonia de abejorros infestada, tiene el potencial de producir más de 10,000 ácaros y ser un vector importante (Yoneda y col. 2008).

*Sphaerularia bombi* es el nematodo más conocido asociado con abejorros, el cual ha sido registrado en casi 30 especies en todo el mundo. Cuando las reinas son afectadas, se altera su comportamiento y en lugar anidar, vuelan cerca del suelo, comienzan a cavar en los sitios de hibernación de otras reinas; el abejorro finalmente muere y los nematodos se reproducen en el lugar preciso para contactar e infectar a una abeja hibernante. En Argentina, *S. bombi* fue detectado en *B. atratus* con una prevalencia de 8-20% (Plischuk y Lange, 2012). En



Uruguay, fue aislado de *B. atratus* y de *B. bellicosus* con una prevalencia superior al 40% para ambas especies, lo que indica un impacto significativo en las poblaciones locales.

Entre los patógenos que afectan a las abejas melíferas, los virus de ARN están emergiendo como una amenaza grave y se sospecha que son los principales contribuyentes al trastorno del colapso de colonias. La detección reciente en abejorros sugiere una amplia diseminación con un impacto potencial importante. Singh y col. (2010) estudiaron la distribución viral en abejas melíferas, en sus cargas de polen, y en otros polinizadores himenópteros incluidos abejorros, recolectados de plantas con flores en Pensilvania, Nueva York e Illinois, E.U. Los virus DWV, SBV y BQCV fueron detectados en polen obtenido de abejas forrajeras no infectadas y en once especies de himenópteros distintos de *Apis*, entre ellas *B. impatiens*, *B. ternarius* y *B. vagans*. Este hallazgo comprueba la existencia de diversos huéspedes virales e implica un posible impacto más profundo en la salud de los insectos polinizadores. En experimentos de invernadero, la transmisión de virus IAPV puede darse de abejas melíferas infectadas a abejorros sanos y viceversa, demostrando que los virus pueden transmitirse de una especie a otra, y los análisis filogenéticos realizados en el mismo estudio, apoyan que estos virus se diseminan libremente entre los polinizadores a través del polen (Singh y col. 2010).

### **2.3. MÉTODOS PARA LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS.**

La actividad microbiana en los alimentos puede tener repercusiones en su preservación. Una deficiente preservación no se limita al deterioro o pérdida de frescura, también puede traer consecuencias en la inocuidad, en donde se ve favorecido el desarrollo de microorganismos patógenos o la generación de toxinas. El control de la actividad microbiana en los alimentos se basa en el uso de diversas tecnologías las cuales pueden tener dos efectos sobre los microorganismos: un retardo en su desarrollo (inhibición) o su destrucción (Fernández, 2008).

Diversos métodos físicos y químicos han sido probados para disminuir las poblaciones de microorganismos en el polen, resultando ser muy agresivos, afectando su calidad nutricional, demostrando bajos efectos letales y altos costos (De Guzman y col. 2011). Los tratamientos más comunes realizados por los productores es el secado a temperaturas reguladas y la congelación (Cardoso y Silva, 2016); el uso de óxido de etileno y ozono también ha sido probados, presentando algunas desventajas como altos costos, cambios físico-químicos y bajos efectos letales (Yook y col. 1998). Las radiaciones ionizantes comienzan a reconocerse como una alternativa para la inactivación de microorganismos patógenos presentes en el polen (Meeus y col. 2014).

### **2.3.1. Radiación gamma**

La radiación gamma es un tipo de radiación electromagnética producida por elementos radioactivos, que genera ondas de alta energía capaces de penetrar en la materia a nivel nuclear, dañando el material genético de las células. La cantidad de energía que es absorbida, se mide en la unidad denominada Gray (Gy) del Sistema Internacional y está definida como la absorción de un Joule de energía en cada kilogramo de producto, de tal manera que 1 kGy equivale a 1000 Gys; los efectos que provocan los tratamientos, dependerán de la dosis de energía ionizante que absorban los productos a procesar y se utiliza esta unidad para cuantificarla (Silindir y Özer, 2009).

#### **2.3.1.1. Proceso de radiación**

Los rayos gamma se forman con la desintegración de Cobalto-60 o Cesio-137. La radiación que proviene del Cobalto 60 en forma de fotones de radiación electromagnética, es absorbida por el material provocando la ionización de sus átomos. La energía de la radiación electromagnética es transferida parcial o totalmente a los electrones que orbitan en el núcleo de los átomos, provocando la ionización y la consecuente aparición de radicales libres y iones con alta

reactividad química. Al recombinarse estas especies químicas altamente activas, provocan los daños en el ADN de las bacterias, eliminándolas o haciéndolas inviables de desarrollarse. Como todos estos efectos son a nivel atómico, dicha recombinación de iones o de radicales libres no induce alguna radioactividad en los materiales a procesar o algún cambio en su composición, por lo que se considera inocuo para los productos (Silindir y Özer, 2009).

### **2.3.1.2. Aplicaciones**

La radiación gamma, es un método actualmente utilizado para la esterilización, desinfección y conservación de diversos materiales, incluidos los alimentos. Es aplicada ampliamente para esterilizar material médico desechable como jeringas, agujas, cánulas, etc. (Mutinelli y Baggio, 2008), cosméticos (Silindir y Özer, 2009), para la conservación de madera destinada para la producción de muebles (Kalawate y Mehetre, 2015), para la desinfección de frutas y verduras (Rajkowski y Thayer, 2000; Berger, 2010) para controlar la producción de micotoxinas (Aziz y Mouss, 2002), para la conservación de jugo de naranja (Lemma y col. 1999), e inactivación de patógenos en carnes rojas, carne de pollo, especias, camarones, entre otros (Farkas, 1998).

Ha sido ampliamente estudiada en los últimas 4 décadas, siendo cada vez más reconocida para reducir las pérdidas por postcosecha de alimentos, asegurando la calidad sanitaria y facilitando el comercio de los productos alimenticios (Yook y col. 1998) y ha resultado ser una alternativa para su conservación y descontaminación de microorganismos patógenos (Rajkowski y Thayer, 2000; Berger, 2010; Takahashi, 2004).

El principio fundamental de la utilización de la radiación en los alimentos es inactivar los patógenos presentes sin causar daño a la calidad dentro de un período de tiempo limitado (Olanya y col. 2015).

La ineficacia y el alto costo de otros métodos de descontaminación condujeron a la utilización de la radiación gamma como un tratamiento alternativo. Los primeros estudios experimentales, realizados en los años 70s, demostraron

que la radiación inactiva las esporas de AFB sin destruir los materiales, proponiendo que una dosis de 10 kGys podría ser valiosa para los apicultores como un tratamiento de desinfección rutinaria de materiales de apicultura. La radiación ha demostrado ser una medida de control eficaz para eliminar los microorganismos en la miel, polen y materiales utilizados para la apicultura (nidos, cera, peines, etc.) (De Guzman y col. 2011; Mutinelli y Baggio, 2008; Baggio y col. 2004; Katznelson y Robb, 1962), como fue demostrado por Meeus y col. (2014), los cuales lograron la reducción del virus Israelí de parálisis aguda (IAPV) inoculado en polen al exponerlo a 16.9 kGys de rayos gamma; por Yook y col. (1998), ellos reportaron una reducción en el contenido de bacterias, hongos y levaduras por debajo de los niveles de detección a dosis de 2.5 a 10 kGys, sin producir cambios significativos en el contenido de proteínas; por Graystock y col. (2016), en donde patógenos de abejas y abejorros como el virus DVW, el IAPV, el sacbrood virus (SBV) y *Nosema ceranae* fueron eliminados por el tratamiento de 16.9 kGys; por De Guzman y col. (2011), una dosis de 15 kGys fue suficiente para inactivar esporas de *Paenibacillus larvae* en colmenas infectadas.

### **2.3.1.3. Ventajas**

El uso de la radiación gamma para la descontaminación de los alimentos ha resultado ser un método seguro y eficiente. No induce radioactividad en los alimentos y no deja radiación residual. La cantidad de energía en que se generan los radicales libres es muy reducida. Los alimentos pueden recibir el tratamiento dentro de su empaque, como un tratamiento terminal, manteniendo su preservación hasta el momento de su consumo. Puede inactivar a los microorganismos en alimentos congelados (Farkas, 1998), tiene una alta letalidad microbiana lo que permite que se extienda la vida de anaquel de una diversidad de alimentos y fortalece su inocuidad. La dosis que se aplica puede ser controlada y ajustable para diversos propósitos, aquellas que son bajas no generan cambios sensoriales y las propiedades nutricionales del alimento no son afectadas (Fernández, 2008). Además, la absorción de esa energía no provoca un aumento

significativo en la temperatura de los productos, habiéndose cuantificado un aumento de 2 o 3 °C únicamente (Silindir y Özer, 2009). No existen pruebas o evidencias de efectos tóxicos, genéticos o teratogénicos por el consumo de alimentos irradiados (Fernández, 2008). La FDA ha evaluado la seguridad durante más de 30 años y ha encontrado que el proceso es seguro. La Organización Mundial de la Salud (OMS), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) también han respaldado la seguridad de los alimentos irradiados. El Codex Alimentarius reconoce que la radiación de alimentos es un método seguro y efectivo y adoptó una norma general para alimentos irradiados (Farkas, 1998).

### **III. HIPÓTESIS**

La aplicación de dosis bajas de radiación gamma a partir de una fuente de  $^{60}\text{Co}$  tendrá un efecto reductor en el crecimiento de bacterias mesófilas aeróbicas, bacterias esporuladas, coliformes totales, hongos y levaduras presentes en alimento para abejorros debido a las características de las ondas de alta energía y su efecto en la viabilidad celular.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General.

Evaluar el efecto de la radiación gamma sobre bacterias mesófilas aeróbicas, bacterias esporuladas, coliformes, hongos y levaduras presentes en alimento destinado para la crianza de abejorros.

### 4.2 Específicos.

1. Determinar el contenido de bacterias mesófilas aeróbicas, bacterias esporuladas, coliformes, hongos, levaduras y *Paenibacillus larvae* presentes en alimento destinado para la producción de abejorros
2. Determinar la dosis de radiación gamma más efectiva para reducir la carga de bacterias mesófilas aeróbicas, esporuladas y coliformes, así como de hongos y levaduras presentes en el alimento para abejorros.
3. Identificar los microorganismos con mayor resistencia a la exposición de la radiación gamma en el alimento a través técnicas moleculares.

## **V. METODOLOGÍA**

### **5.1. Descripción y toma de muestras.**

El polen utilizado para la producción de los abejorros provino de tres fuentes de origen: México, Chile y Holanda, el cual fue proporcionado por la empresa Koppert, S.A. de C.V. ubicada en el Estado de Querétaro, Municipio El Marqués.

El alimento fue preparado por el personal de la empresa y fue proporcionado en pellets para la alimentación de los nidos. El polen se mezcló con solución de fructosa (48° Brix) y se homogenizó mediante una amasadora industrial hasta obtener una consistencia suave. Con esta masa se formaron pellets de 13 gramos que fueron almacenados en congelación hasta su uso.

Las muestras fueron tomadas en condiciones asépticas. Los materiales utilizados para su toma (espátulas, frascos, tubos, guantes, bolsas, etc.) se encontraban estériles para evitar la contaminación de fuentes externas.

Una vez tomadas las muestras, éstas se sellaron y marcaron. Se transportaron al laboratorio en hieleras (NOM-109-SSA1-1994; Bacteriological Analytical Manual. 1995).

### **5.2. Determinación del contenido microbiano de interés sanitario en el alimento para abejorros.**

Se analizaron 33 muestras provenientes de Holanda, 6 de México, 6 de Chile y 6 de la mezcla de Holanda, México y Chile, por triplicado de muestra, obteniendo un total de 306 determinaciones microbiológicas.

Se determinó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), bacterias mesófilas esporuladas (BME) (descrito en apartado 7.1.2.1), organismos coliformes totales (OCT), hongos y levaduras (H/L).

1. Se pesaron 10 gramos de muestra en una bolsa. A cada bolsa se agregaron 90 mL de diluyente de peptona (DP); la muestra se homogenizó manualmente durante 1 minuto.



2. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones decimales en DP para los recuentos de BMA, BME, OCT y H/L por la técnica de vaciado en placa y *P. larvae* por extensión en superficie.
3. Las placas de cada grupo microbiano se incubaron en las condiciones de tiempo y temperatura recomendadas en técnicas oficiales (NOM-092; NOM-113; NOM-111; Vanderzant, 1992; Feás y col. 2012).
4. Se realizó el recuento de colonias desarrolladas en cada placa de cada grupo microbiano y el cómputo de resultados en ufc/g de alimento.

### **5.2.1. Tratamiento para germinación de esporas.**

1. Se pesaron 10 g de cada muestra en una bolsa. Se agregaron 90 mL de D.P. Se homogenizó durante 1 minuto manualmente para lograr el desprendimiento de los microorganismos.
2. A partir de esta suspensión, se inocularon 10 mL en un frasco con 100 mL de Agar Dextrosa Triptona (ADT), conservado a 45°C. Los frascos se agitaron suavemente para lograr la dispersión del inóculo en el medio de cultivo.
3. El tratamiento de germinación de esporas se realizó introduciendo los frascos inoculados en un baño con agua (en agitación) a 80°C durante 10 min. Al término del tiempo, los frascos fueron transferidos a otro baño con agua a 45°C para detener el tratamiento.
4. El contenido de cada frasco fue vaciado y distribuido homogéneamente en 5 placas estériles, respectivamente. Cuando el agar se solidificó, las placas se incubaron a 35°C por 48-72 hr.
5. Se realizó el recuento de colonias desarrolladas en cada placa y el cómputo de resultados en ufc/g de alimento (Vanderzant y Splittstoesser, 1992; De Guzman y col. 2011).

## **5.2.2. Aislamiento e identificación de *Paenibacillus larvae***

### **5.2.2.1. Aislamiento de colonias sospechosas**

Para la detección de *P. larvae*, las muestras de alimento fueron procesadas como se describe en la sección 7.1.2.1, apartado 1, 2 y 3. Una vez realizado el tratamiento de germinación de esporas, se inocularon 100  $\mu$ L en placas que contenían agar MYPGP, PLA y ADT y se incubaron a 35 °C durante 8 días. Posteriormente, las colonias desarrolladas con fenotipos sospechosos de *P. larvae* fueron sembradas en AST e incubadas a 35 °C por 48 hr. Una vez desarrolladas, se verificó su pureza por medio de una tinción de Gram y observación al microscopio.

### **5.2.2.2. Identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Una porción (asada) de cada colonia sospechosa fue suspendida en 50 $\mu$ L de agua destilada estéril, de esta suspensión bacteriana, 1 $\mu$ L fue transferido a una mezcla de reacción de PCR que contenía 7  $\mu$ L de Master Mix, 7  $\mu$ L de agua DPEC, 1  $\mu$ L del Primer FD1, 1  $\mu$ L Primer RD1, usando una DNA polimerasa Thermo scientific phusion high-fidelity y se realizó la amplificación del segmento DNAr 16S.

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un Arktik Thermal Cycler bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 40 segundos, y 72°C por 2 minutos; y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

El producto de PCR fue verificado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. 1g de agarosa Ultrapure se disolvió por ebullición en 100mL de una solución de TAE al 1X. La solución se colocó en un molde de la cámara de electroforesis hasta polimerizar. Después se llenó la cámara con TAE 1X, hasta cubrir completamente el gel. Se colocaron 5 $\mu$ L de colorante y 5 $\mu$ L de muestra en los

pozos del gel, se aplicó un voltaje de 80 volts por 45 minutos. El gel se observó en un sistema de documentación y análisis de electroforesis con luz ultravioleta.

Una cepa de *P. larvae* ATCC 9545 fue utilizada como control positivo para el aislamiento e identificación por PCR.

### **5.3. Determinación del efecto de radiación gamma en el alimento**

#### **5.3.1. Tratamientos de radiación**

Se evaluaron cuatro dosis de radiación: 2.5, 5.0, 7.0 y 9.0 kGys. El alimento (polen procesado) fue enviado en hieleras de unicel que contenían alrededor de 10 kg a las instalaciones de la planta especializada en radiación de alimentos BENEION (Matehuala, San Luis Potosí) en un transporte refrigerado para evitar su descongelamiento. La radiación se efectuó por medio de un generador de protones MDS NORDION una fuente de  $\text{Co}^{60}$ .

#### **5.3.2. Efecto en la carga microbiana**

Se analizaron un total de 4 lotes de alimento, cada uno proveniente de Holanda, México, Chile y una mezcla de los tres, con 3 réplicas y por triplicado de cada réplica (102 muestras), obteniendo un total de 510 determinaciones microbiológicas.

Se determinó el contenido de BMA, BME, OCT y H/L de las muestras de alimento (descrito en sección 5.2 y 5.2.1) antes y después de las dosis de exposición a la radiación.

#### **5.3.3. Efecto de la radiación gamma en el contenido de proteína y humedad**

Se colectó una muestra de 100 gr de alimento elaborado con polen de Holanda antes y posterior a los tratamientos de radiación, la cual fue enviada a los

laboratorios CENCON para cuantificar su contenido de proteína y humedad. El análisis de la muestra se realizó por triplicado.

#### **5.3.4. Análisis estadístico.**

Para determinar las diferencias en el contenido microbiano de las tres fuentes de origen del polen y para evaluar el efecto de los tratamientos de radiación sobre la carga microbiana se utilizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) usando el software Minitab®. Para las características proximales, se realizó una prueba de t-Student de muestras apareadas utilizando el software SPSS versión 20.0 para Windows (IBM, 2011).

#### **5.4. Identificación de bacterias con mayor resistencia a la radiación.**

##### **5.4.1. Aislamiento de bacterias resistentes.**

De las bacterias sobrevivientes al tratamiento de radiación, se seleccionaron colonias y se sembraron en Agar Soya Trypticaseína (AST), para lograr su aislamiento individual.

Se incubaron a 37°C por 48-72 h y posteriormente se verificó su pureza. Una vez obtenido el cultivo fresco, se continuó con el proceso de identificación.

##### **5.4.2. Identificación por técnicas moleculares.**

Los cultivos frescos y puros de las bacterias resistentes a las diferentes radiaciones, se sometieron al proceso de identificación que fue realizado por el método de identificación de Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight (MALDI TOF)-MS Biotyper® y análisis del gen 16S ribosomal (rDNA).

#### **5.4.2.1. Identificación por MALDI TOF-MS Biotyper®**

La identificación bacteriana fue realizada por el procedimiento operativo estándar, método extendido de transferencia directa, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania). Técnica analítica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos al permitir la medición de iones derivados de moléculas, separándolos de las muestras en función de su masa.

- Cada colonia bacteriana (cultivo puro) se mezcló con una matriz (500 µL ácido hidroxicinámico + solvente estándar) sobre una tarjeta metálica, de tal forma que ambas cristalicen cuando se evapora el solvente
- Posteriormente esta preparación fue irradiada con un láser, en condiciones de alto vacío. La matriz absorbe esta energía y la transfiere a la muestra, provocando su ionización. El área irradiada se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa creando una densa nube de gas entre dos electrodos formando un campo eléctrico que se emplea para acelerar la muestra hasta el detector. Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, y llegan primero al detector, una vez en este, se genera el perfil o huella química específico de esa muestra (Sandrin *y col.* 2012).
- Los espectros generados se compararon con la base de datos del equipo, la cual establece un puntaje de identificación confiable: > 2,000 permite la identificación a nivel de especie, entre 1,700-1,999 la identificación es a nivel de género, mientras que valores < 1,700 no permiten identificación.

#### **5.4.2.2. Identificación por DNAr 16s**

Por otro lado, su identificación se completó además mediante análisis del gen 16S ribosomal (rDNA) y con el cual se confirmó el género y se determinó la especie.

1. Se efectuó la técnica de PCR de las colonias para amplificar el fragmento génico, empleando los oligonucleótidos FD1: 5'- CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G y RD1: 5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC (Invitrogen) que amplifican un segmento del gen de aproximadamente 900 pb.
2. El programa de PCR se llevó a cabo en un Arktik Thermal Cycler bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 40 segundos, y 72°C por 2 minutos; y una extensión final de 5 minutos a 72°C.
3. El producto de PCR fue verificado en un gel de agarosa al 1% y se purificó utilizando el kit DNA Clean and Concentrator -5 kit (ZymoResearch).
4. Una vez purificado, el producto de PCR fue enviado a secuenciar. Las secuencias resultantes se compararon con las secuencias del banco de datos del NCBI mediante a un análisis BLAST para buscar homologías con los microorganismos ya reportados.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Contenido microbiano en alimento de *Bombus impatiens*

Se determinó el contenido microbiano del alimento que es proporcionado a *B. impatiens* durante su crianza masiva. Un total de 17 muestras fueron analizadas. En el Cuadro 7 se presenta el resumen de los grupos microbianos analizados en alimento de tres fuentes de origen y la mezcla.

**Cuadro 7. Contenido microbiano en alimento para abejorros proveniente de 3 fuentes de origen**

Origen de polen	BMA	BME	OCT	Hongos	Levaduras
Promedio log ufc/g					
Holanda <sup>1</sup>	3.94 (±0.59) B	3.43 (±0.33) A	2.18 (±0.57) A	2.81 (±0.37) B	3.61 (±0.53) A
Chile <sup>2</sup>	4.34 (±0.16) B	3.16 (±0.24) A	2.64 (±0.43) A	3.27 (±0.49) A	2.81 (±0.31) B
México <sup>2</sup>	5.22 (±0.40) A	3.60 (±0.26) A	2.74 (±0.24) A	3.72 (±0.21) A	3.13 (±0.30) AB
Mezcla <sup>2</sup>	5.25 (±0.40) A	3.22 (±0.17) A	2.70 (±0.35) A	3.69 (±0.21) A	3.34 (±0.54) AB

Letras diferentes muestran diferencias significativas

<sup>1</sup>Número de muestras = 11 (triplicado)

<sup>2</sup>Número de muestras = 2 (triplicado)

Se obtuvieron cifras mayores de 2 log ufc/g en todos los grupos de microorganismos analizados. Las BMA fueron las más abundantes en todas las fuentes de origen de polen estudiadas, siendo la Mezcla la que presentó los más altos recuentos, con 5.25 log ufc/g y el menor contenido fue para los coliformes, con 2.18 log ufc/g obtenidos en las muestras de Holanda. Las muestras de México fueron las que presentaron los más altos contenidos de BME (3.60 log ufc/g), coliformes (2.74 log ufc/g) y hongos (3.72 log ufc/g), mientras que las de Holanda sobresalieron las levaduras (3.61 log ufc/g).

Los resultados coinciden con Serra y Escolá (1997), los cuales obtuvieron una concentración mayor a 3 log ufc/g de BMA y de hongos, además de la presencia de esporulados como *Bacillus* en polen procedente de España, en Corea, Yook y col. (1998) encontraron valores cercanos a 5, 4 y 2 log de BMA, levaduras y hongos respectivamente, mientras Feás y col. (2012) y obtuvieron recuentos de aproximadamente 3 log para los mismos grupos microbianos, Estevinho y col. (2012) reportaron el 60% de muestras con levaduras y hongos y 40% con BMA, con valores de  $10^2$  a  $10^3$  ufc/g en polen de origen portugués.

Las poblaciones de microorganismos analizadas en el polen, funcionan como indicadores del nivel de sanidad o calidad sanitaria presente en el alimento para *B. impatiens* e influyen en su preservación e inocuidad. Contenidos altos de hongos y levaduras en productos de origen vegetal se asocian con la presencia de suelo o polvo, o materiales contaminados con éstos; aquellos con capacidad para deteriorar provocan olores y sabores desagradables y disminuyen su vida de anaquel. Las cifras elevadas de BMA y esporulados ponen de manifiesto la exposición a fuentes de contaminación desde que el polen es generado en las anteras de las flores, entre ellas se encuentran el suelo, el aire, el agua, los insectos polinizadores; la manipulación directa en la colecta, almacenamiento y comercialización. Los esporulados son frecuentes en el suelo y en alimentos expuestos a ella. Los productos vegetales por regla general contienen a estas bacterias y algunas son de naturaleza patógena como *P. larvae*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*. Típicamente son los coliformes totales los que suelen emplearse en el control de la calidad sanitaria; su hallazgo involucra la presencia de materia fecal, sin embargo, es importante señalar que entre las bacterias incluidas dentro de los coliformes recuperados de muestras vegetales, una proporción elevada corresponde a gérmenes que son propios de las plantas (por ejemplo *Erwinia*), es decir, epifíticos, y no necesariamente provienen de la materia fecal (Fernández, 2008). Otros factores que influyen en los niveles altos de contaminación del polen es el origen geográfico en donde la humedad y la temperatura de las zonas de producción pueden influir en la sobrevivencia de los microorganismos. El alto contenido de nutrientes, el pH, la  $A_w$ , el proceso de



secado y las condiciones de almacenamiento también son factores importantes (Bárbara y col. 2015).

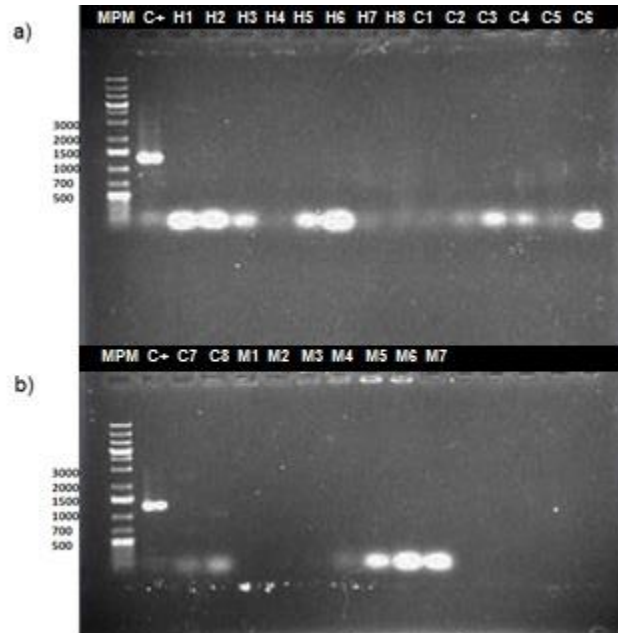
Al comparar los resultados del contenido microbiano proveniente de las tres fuentes de origen con los criterios microbiológicos establecidos para el polen (cuadros 3 y 4), las BMA, los hongos y levaduras presentes en muestras de México y los coliformes en muestras de Holanda, sobrepasaron los máximos límites permisibles. Ambas normas no incluyen la detección de patógenos para abejorros, no obstante, incluyen a bacterias patógenas para humanos, debido a que fueron elaboradas para polen destinado para el consumo humano. La norma brasileña, en cambio, si incluye a *P. larvae*. Los criterios microbiológicos establecidos para cada país varían dependiendo del nivel socioeconómico y susceptibilidad de la población a las enfermedades transmitidas por los alimentos, sin embargo, la Unión Europea y Mercosur están haciendo un esfuerzo para unificar criterios que garanticen un polen de alta calidad. En México es necesario tener una vigilancia del cumplimiento de las normas, una actualización que incluya técnicas rápidas y confiables para regular la calidad de la producción nacional del polen.

La población microbiana en polen ha sido muy poco estudiada en nuestro país, por lo que los resultados obtenidos en este estudio aportan información acerca de la calidad del polen. Es importante realizar un estudio más profundo para conocer en qué punto (desde su colecta hasta su consumo) el alimento está mayormente expuesto a la contaminación. Las empresas productoras de abejorros deben tomar medidas que procuren un ambiente sano para los insectos, entre ellas, la selección de proveedores de polen que garanticen un producto inocuo para disminuir riesgos de contaminación en los insectos, el constante monitoreo del alimento y de las buenas prácticas sanitarias a lo largo de la producción de los abejorros y aplicar medidas correctivas o tratamientos de descontaminación del alimento antes de ser suministrado a los insectos.

*P. larvae* no fue detectado en ninguna muestra. Se aislaron 57 colonias sospechosas de acuerdo a las características fenotípicas de cultivo (agar MYPGP, PLA y ADT) procedentes de Holanda, 70 de Chile y 53 de México. Un pool de 7

colonias sospechosas de Holanda fueron mezcladas en un tubo eppendorf, teniendo un total de 8 tubos para ser amplificados. Un pool de 9 colonias sospechosas de Chile fueron mezcladas en un tubo eppendorf, obteniendo y para México, el pool fue de 7 colonias por tubo un total de 8 tubos para ser amplificados. El producto de amplificación de PCR de *P. larvae* ATCC 9545 con un tamaño de amplificación de 1269 pb se muestra en la figura 2, mientras que las colonias sospechosas de *P. larvae* ninguna presento un producto de amplificación similar.

**Figura 2. Detección de *P. larvae* por PCR en alimento para abejorros**



Apartado **a)** MPM: Marcador de Peso Molecular 1Kb (Thermo Scientific DNA Ladders). C+: Control positivo *P. larvae* ATCC 9545. Carril H1 al H8 y C1 al C6 corresponden a colonias sospechosas de *P. larvae* aisladas de alimento elaborado con polen de Holanda y de Chile respectivamente. Apartado **b)** MPM: Marcador de Peso Molecular 1Kb (Thermo Scientific DNA Ladders). C+: Control positivo *P. larvae* ATCC 9545. Carril C7 y C8, y M1 al M7 corresponden a colonias sospechosas de *P. larvae* aisladas de alimento elaborado con polen de Chile y de México respectivamente.

A pesar de obtener contenidos altos de esporulados en el alimento para abejorros, no fue detectado el patógeno *P. larvae*. Nuestros resultados concuerdan con Graystock y col. (2016), reportando la ausencia de la bacteria en muestras de polen. Sin embargo, el germen tiene una distribución cosmopolita y

ha sido detectada en productos apícolas como la miel, panales y polen procedente de Brasil a través de PCR por medio de la amplificación específica del gen ADNr 16S (Chagas y col. 2012). Ryba y col. (2009) lograron identificar a través de PCR a *P. larvae* de restos de colmenas infectadas. Actualmente en nuestro laboratorio se está realizando un estudio con la técnica de secuenciación masiva (metagenoma) para conocer la microbiota en muestras de polen, sin recurrir a técnicas de cultivo, la cual podrá ser una herramienta útil para detectar patógenos.

## **6.2 Determinación del efecto de radiación gamma en microorganismos de interés sanitario presentes en alimento para abejorros.**

Un total de 13 muestras fueron analizadas, 10 correspondieron a alimento elaborado con polen proveniente de Holanda, 1 para México, 1 para Chile y 1 para Mezcla. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado. Las dosis probadas fueron de 0, 2, 5, 7 y 9 kGys, sin embargo, debido a las condiciones del proceso las dosis alcanzadas fueron de 2.5, 5.98, 7.25 y 9.25 kGys.

En el cuadro 8 se presentan los cambios en la carga microbiana en alimento proveniente de Holanda, mientras que en el cuadro 9 se muestran las tres fuentes de origen (Holanda, México y Chile) y la Mezcla. Las poblaciones de BMA, esporulados, coliformes totales, hongos y levaduras fueron reducidas después de ser expuestos a los cuatro tratamientos de radiación gamma. A partir de 2 kGys disminuyeron significativamente las poblaciones de todos los grupos microbianos.

**Cuadro 8. Efecto de la radiación gamma sobre la población microbiana en alimento**

Tratamiento	BMA	BME	OCT	Hongos	Levaduras
kGys	Promedio log ufc/g				
0 <sup>1</sup>	3.75 (±0.16) A	3.50 (±0.03) A	2.18 (±0.04) A	2.66 (±0.04) A	3.45 (±0.06) A
2 <sup>2</sup>	2.34 (±0.12) B	2.97 (±0.08) B	1.50 (±0.11) B	1.37 (±0.12) B	1.32 (±0.27) B
5 <sup>2</sup>	0.38 (±0.24) C	1.41 (±0.28) C	0.16 (±0.16) C	0 (±0.00) C	0.79 (±0.26) C
7 <sup>2</sup>	0.55 (±0.25) C	1.34 (±0.27) C	0 (±0.00) C	0 (±0.00) C	0.21 (±0.21) C
9 <sup>2</sup>	0 (±0.00) C	1.23 (±0.23) C	0 (±0.00) C	0 (±0.00) C	0 (±0.00) C

Letras diferentes muestran diferencias significativas

<sup>1</sup>Número de muestras = 7 (triplicado)

<sup>2</sup>Número de muestras = 3 (triplicado)

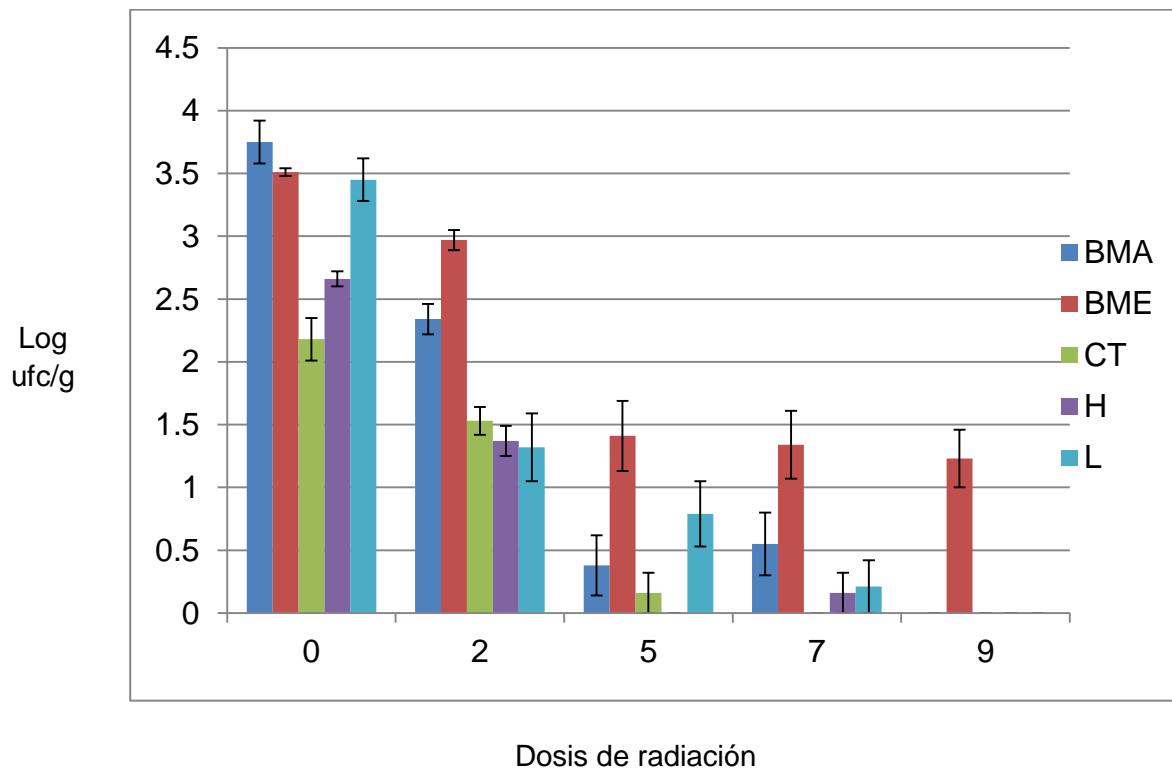
**Cuadro 9. Efecto de la radiación gamma en tres fuentes de origen**

Microorganismo	Fuente de polen	Dosis de Radiación Gamma (kGys)		
		0	7	9
BMA	Holanda	4.65 (±0.09)a	1.16 (±0.63)a	0.00 (±0.00)a
	México	5.23 (±0.22)ab	3.15 (±0.08)b	0.55 (±0.24)a
	Chile	4.35 (±0.04)a	1.99 (±0.02)ab	0.00 (±0.00)a
	Mezcla	5.62 (±0.31)b	1.69 (±0.15)ab	0.00 (±0.00)a
	Estadístico	F	8.172	6.588
	P	0.008	0.015	0.60
BME	Holanda	3.62 (±0.04)b	2.04 (±0.07)a	2.30 (±0.22)b
	México	3.64 (±0.08)b	1.85 (±0.20)a	2.56 (±0.15)b
	Chile	3.21 (±0.00)a	0.76 (±0.39)a	0.00 (±0.00)a
	Mezcla	3.24 (±0.06)a	1.50 (±0.36)a	2.60 (±0.04)b
	Estadístico	F	16.715	3.827
	P	0.001	0.057	0.000
Hongos	Holanda	3.37 (±0.02)a	0.00 (±0.00)a	0.00 (±0.00)a
	México	3.76 (±0.04)b	1.78 (±0.09)b	0.00 (±0.00)a
	Chile	3.45 (±0.09)ab	0.43 (±0.43)ab	0.00 (±0.00)a
	Mezcla	3.71 (±0.08)b	0.92 (±0.46)ab	0.00 (±0.00)a
	Estadístico	F	7.424	5.663
	P	0.011	0.022	-
Levaduras	Holanda	4.48 (±0.25)b	0.00 (±0.00)a	0.00 (±0.00)a
	México	3.14 (±0.18)a	1.87 (±0.14)a	0.00 (±0.00)a
	Chile	2.85 (±0.12)a	1.14 (±0.58)a	0.00 (±0.00)a
	Mezcla	3.53 (±0.20)a	1.44 (±0.73)a	0.00 (±0.00)a
	Estadístico	F	13.145	2.87
	P	0.002	0.10	-
Coliformes totales	Holanda	2.43 (±0.15)a	0.00 (±0.00)a	0.00 (±0.00)a
	México	2.77 (±0.08)a	1.61 (±0.08)b	0.00 (±0.00)a
	Chile	2.73 (±0.17)a	0.76 (±0.39)ab	0.00 (±0.00)a
	Mezcla	2.75 (±0.09)a	1.02 (±0.51)ab	0.00 (±0.00)a
	Estadístico	F	1.382	4.222
	P	0.317	0.046	-

El contenido de hongos y coliformes fue reducido por debajo de los niveles de detección a partir de 5.98 y 7.25 kGys respectivamente. Las BMA y levaduras lograron todavía ser detectadas a la radiación de 7.25 kGys, mientras que los esporulados aún fueron detectados a una dosis de 9.25 kGys.

La figura 3 muestra la reducción de las poblaciones microbianas conforme las dosis de radiación aumentaron (muestras de Holanda). La reducción tuvo un promedio de 2, 2.5, 2.6 y 3.3 log ufc/g en los grupos estudiados a dosis de 2.5, 5.98, 7.25 y 9.25 kGys. de 3.3 log ufc/g respectivamente.

**Figura 3. Reducción de la población microbiana en alimento por exposición a la radiación gamma**



Estos resultados concuerdan con Yook y col. (1998) quienes reportaron una reducción en la cantidad de bacterias aerobias, hongos y levaduras por debajo de los niveles de detección a dosis de 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 kGys. Dichas dosis no produjeron reducciones significativas en el contenido de proteína de las muestras expuestas hasta los 7.5 kGys, concluyendo que la radiación gamma fue efectiva para reducir el contenido de microorganismos en el polen.

Otros estudios han demostrado que la radiación gamma es efectiva para inactivar patógenos presentes en polen, miel, cera y materiales de apicultura (Baggio y col. 2005; Al-Waili y col. 2012; Meeus y col. 2014).

Los procedimientos generalmente utilizados para la conservación de polen, no siempre aseguran un producto inocuo, por ejemplo, la temperatura del secado antes de ser empacado, no debe exceder de los 40 °C (Cardoso y Silva, 2016), sin embargo, esa temperatura no es suficiente para la eliminación de bacterias patógenas, como lo demostraron Puig-Peña y col. (2012), en donde el secado a 42 °C logró la disminución de la microbiota del polen, sin embargo aún detectaron la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positiva y *Salmonella* Javiana, sugiriendo otros métodos adicionales para su descontaminación.

Los tratamientos de radiación gamma realizados en el alimento para abejorros también tuvieron un efecto en su preservación (figura 4). Después de ser irradiado a 7 y 9 kGys, el alimento fue almacenado a 4<sup>o</sup> C durante 1 año y 4 meses. A lo largo de ese tiempo, éste no mostró signos visibles de deterioro, sin embargo, el alimento que no recibió ningún tratamiento, presentó desarrollo filamentoso (micelio) de hongos aproximadamente 30 días después de ser almacenado a la misma temperatura.

**Figura 4. Alimento irradiado a 7 y 9 kGys y almacenado a 4<sup>o</sup> C.**

a) 7 kGys



b) 9 kGys



### 6.3 Efecto de la radiación en el contenido de proteína y humedad del alimento

Los resultados del análisis del contenido de proteínas y humedad de las muestras de polen irradiado se muestran en el cuadro 10.

**Cuadro 10. Efecto de la radiación gamma en el contenido de proteína y humedad en el alimento**

Tratamiento	Proteína (%)	<i>P</i>	Humedad (%)	<i>P</i>
2 kGys	14.81 (±0.03)	1.000	30.37 (±0.05)	0.867
Control	14.81 (±0.01)		30.39 (±0.08)	
5 kGys	15.07 (±0.03)	0.965	30.77 (±0.09)	0.946
Control	15.08 (±0.03)		30.78 (±0.01)	
7 kGys	15.45 (±0.05)	0.784	29.81 (±0.10)	0.411
Control	15.46 (±0.07)		30.00 (±0.10)	
9 kGys	12.95 (±0.01)	0.164	26.89 (±0.05)	0.764
Control	13.19 (±0.11)		26.92 (±0.05)	

Los valores de *P* obtenidos son menores o igual a 1.0 para cada una de las radiaciones probadas (2.5 kGys – 9 kGys), demostrando que no hay diferencias significativas en el contenido de proteína y humedad entre las muestras y el control. El contenido promedio de proteínas fue de 12.95 a 15.46% con una diferencia entre alimento radiado y no radiado de 0.12%. El contenido promedio de humedad fue de 26.89 a 30.78%. La diferencia entre las muestras fue de 0.30%.

Los resultados concuerdan con Yook y col. (1998) y con Snizhko y col. (2015) quienes reportaron que una dosis de 7.5 y de 2-8 kGys respectivamente, no afectó el contenido de proteínas en muestras de polen analizadas, concluyendo



que la radiación gamma es un método efectivo para la preservación de sus propiedades físico-químicas del polen.

#### 6.4. Identificación de microorganismos con mayor resistencia a la exposición de la radiación gamma

Los esporulados presentes en el alimento fueron los que tuvieron la mayor resistencia a las 4 dosis estudiadas y fueron identificadas. Un total de 10 géneros y 28 especies fueron identificadas de las tres fuentes de origen (Cuadros 11, 12 y 13).

**Cuadro 11. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de Holanda**

<b>0 kGy</b>	<b>2 kGy</b>	<b>5 kGy</b>	<b>7 kGy</b>	<b>9 kGy</b>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Paenibacillus cookie</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus mycooides</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i>	
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>			
<i>Bacillus sonorensis</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Bacillus mojavensis</i>				
<i>Massilia timonae</i>				
<i>Paenibacillus odorifer</i>				
<i>Paenibacillus peoriae</i>				
<i>Paenibacillus polymyxa</i>				
<i>Pantoea agglomerans</i>				
<i>Planomicrobium glaciell</i>				
<i>Streptomyces sp</i>				
<i>Virgibacillus alimentarius</i>				

**Cuadro 12. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de México**

<b>0 kGys</b>	<b>7 kGys</b>	<b>9 kGys</b>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus mojavensis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	
<i>Bacillus thuriangiensis</i>		

**Cuadro 13. Bacterias resistentes a radiación gamma provenientes de polen de Chile**

<b>0 kGys</b>	<b>7 kGys</b>	<b>9 kGys</b>
<i>Bacillus altitudinis</i>	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	<i>Bacillus endophyticus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus mojavensis</i>		
<i>Bacillus pumilus</i>		
<i>Bacillus mycoides</i>		

Los géneros predominantes en todas las muestras fueron *Bacillus* y *Paenibacillus*. La especie de *Bacillus pumilus* fue la más predominante en las diferentes muestras de polen seguidas de *B. cereus* y *B. subtilis*, y mostró gran capacidad para resistir las mayores dosis de radiación probadas. Dicha capacidad ya ha sido demostrada en otros estudios, en donde suele ser utilizada como

control para evaluar la efectividad de las radiaciones. La presencia de *Bacillus* spp. en muestras de polen es frecuente (Gilliam, 1979) y su resistencia a las radiaciones gamma es alta (7.5 kGys) (Yook y col. 1998).

Las esporas de diversas especies de *Bacillus* y *Clostridium* son las formas de vida más resistentes conocidas. Tienen diferentes mecanismos de resistencia como el bajo contenido de agua del núcleo de la spora, el cual reduce la capacidad de la radiación gamma para generar radicales libres; las capas externas de la spora, participan en la desintoxicación de productos químicos reactivos; la membrana interna relativamente impermeable restringe el acceso de productos tóxicos al núcleo de la spora que contiene el ADN de la spora y el alto nivel de ácido dipicolínico protege las macromoléculas del núcleo contra los efectos del calor y la desecación, todos estos mecanismos protegen al ADN de la radiación o si fue dañado, permiten lograr su reparación (Sedlow, 2014).

La importancia de las bacterias formadoras de esporas encontradas en este estudio destacan por tener una posible participación como patógenos primarios o secundarios; *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus glucanolyticus* y *Paenibacillus pabuli* han sido aisladas de larvas de abejorros con síndrome de ennegrecimiento de larvas (Pridal, 2002).

Las bacterias *Massilia timonae*, *Planomicrobium glaciell*, *Virgibacillus alimentarius*, *Aerococcus viridans*, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* no han sido reportadas en polen. Por otro lado, *Pantoea agglomerans*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, fue detectada en muestras de polen procedente de Bulgaria, con una incidencia de 23-77%, ha sido utilizada como un antagonista en enfermedades fúngicas de las plantas (Dinkov, 2018). *Pseudomonas stutzeri* mostró una gran resistencia a 9 kGy de radiación, es una bacteria altamente resistente a los desinfectantes químicos y no ha sido reportada su resistencia a radiaciones altas. Algunas especies de *Pseudomonas* son consideradas como parte de la microbiota natural del polen y participan aportando metabolitos que pueden inducir la maduración del polen, aumentando su valor nutritivo y la disponibilidad de aminoácidos (Gilliam, 1997).

## VII. CONCLUSIONES

1. El alimento contiene altos contenidos microbianos ( $>3$  log ufc/g de BMA, BME, H y L) en las tres fuentes de origen, lo que indica una alta exposición a fuentes de contaminación.
2. No fue detectado *P. larvae* en ninguna de las muestras analizadas.
3. Se obtuvo una reducción significativa a partir de 2 kGys de las poblaciones de cada grupo microbiano analizado (BMA, BME, CT, H y L) presentes en el alimento.
4. La dosis más efectiva para reducir las poblaciones microbianas de BMA, OCT, H y L por debajo de los niveles de detección fue la de 9 kGys, excepto para las BME.
5. No se detectaron cambios significativos en el contenido de proteína y humedad en alimento expuesto a las cuatro dosis de radiación.
6. Las bacterias esporuladas identificadas, mostraron similar diversidad entre las tres fuentes de polen analizadas.
7. Se identificaron 28 especies expuestas a los tratamientos de radiación y las de mayor resistencia (9kGys) identificadas fueron *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus cookii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus endophyticus*.
8. En base a los resultados obtenidos se logró establecer una dosis efectiva de 7 kGys para ser usada en el control de calidad del alimento destinado para la alimentación de los abejorros en la empresa Koppert México.

## VIII. REFERENCIAS

- Abrol D.P. 2012. *Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production*, Springer Science+Business Media.EUA. 812 p.
- Alippi A.M. 1999. Bacterial diseases. In: Colin M.E., Ball B.V., Kilani M. (eds.). *Bee disease diagnosis*. Zaragoza: CIHEAM. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*. 25, 31 p.
- Anderson K. E., Sheehan T. H., Eckholm B. J., Mott B. M., DeGrandi-Hoffman G. 2011. *Insectes Sociaux*, DOI 10.1007/s00040-011-0194-6.
- Arbetman M. P., Meeus I., Morales C. L., Aizen M. A., Smaghe G. 2013. Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological Invasions*. 15, 489–494.
- Aronstein K. A. y Murray K. D. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103, S20–S29.
- Aziz N. H. y Moussa L. A. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, 13, 281-288.
- Bacteriological Analytical Manual*. 1995. AOAC International. Third edition. 115p.
- Baggio A., Gallina A., Dainese N., Manzinello C., Serra G., Colombo R., Bárbara M.S., Machado C.S., Sodr  G.D.S., Dias L.G., Estevinho L.M., De Carvalho C.A.L. 2015. Microbiological assessment, nutritional characterization and phenolic compounds of bee pollen from *Mellipona mandacaiia* Smith, 1983. *Molecules*, 20, 12525-12544.
- Belhadj H., Harzallah D., Dahamna S. y Khenouf S. 2014. Microbiological quality control of marketed pollen. *Der Pharmacia Lettre*, 6, 37–42.
- Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397.
- Brindza J., Gr f J., Bacig lov  K., Ferienc P. y Tóth D. 2010. Pollen microbial colonization and food safety. *Acta Chimica Slovaca* 3, 95–102.

- Brodtschneider R., Moosbeckhooper R., Crailsheim K. 2010. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies a 2 year case study in Austria and South Tyrol, Tyrol. *Journal Apicultural Research*, 49, 23-30.
- Brødsgaard H., Brodsgaard C., Hansen H., Lövei G. 2003. Environmental risk assessment of transgene products using honeybee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie*, 34, 139-145.
- Bumblebees in High Tunnels. 2012. Bumblebees lifecycle (<http://www.slideshare.net/UMNfruit/minnesota-high-tunnel-presentation>).
- Buchmann S.L. 1985. Bees use vibration to aid pollen collection from non-poroidal flowers. *J. Kans. Entomological Society*, 58, 517-525.
- Campos M., Bogdanov S., Almeida-Muradian L., Szczesna T., Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2), 156–163.
- Campuzano-Hernández R. 2010. Situación actual de la importación de abejorros *Bombus impatiens*. Consultado 13 octubre 2017. ([http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs\\_17a\\_reunion/comite07/Rocio\\_Campuzano\\_Hernandez.pdf](http://www.conasamexico.org.mx/conasa/docs_17a_reunion/comite07/Rocio_Campuzano_Hernandez.pdf)).
- Cardoso S. M. y Silva A. M. S. 2016. Chemistry, Biology and Potential Applications of Honeybee Plant-Derived Products. Bentham eBooks, 473 p.
- Carpina E., Sabatini A. G., Wallner K., Piro R., Mutinelli F. 2004. *Apiacta*, 39, 1-4.
- Banda H.J. y Paxton R.J. 1991. Pollination of greenhouse tomatoes by bees. Sixth International Symposium of Pollination. *Acta Horticulturae*, 288, 194-198.
- Chagas S. S., Vaucher R. A., Brandeli A. 2012. Characterization of *Paenibacillus* larvae isolate from Brazil. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 10, 79-83.
- Choi Y. H., Kang N. J., Park K. S., Chun H., Cho M. W., Um Y. C., You H.Y. 2009. Influence of fruiting methods on fruit characteristics in cherry tomato. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 27(1), 62-66.
- Cohen A.C. 2003. *Insect diets: Science and Technology*. CRC Press; Boca Raton, USA. 324 p.

- Cox-foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., Van Engelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J.H., Cui L.W., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W. I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318, 283-287.
- Crailsheim K. y Stolberg E. 1989. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of hypopharyngeal glands in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Pathology*, 35, 595-602.
- DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E., Huang M. H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 56, 1184-1191.
- De Guzman Z.M., Cervancia C. R., Dimasuay K. G. B., Tolentino M. M., Abrera G. B., Cobar M. L. C., Fajardo A. C., Sabino N. G., Manila-Fajardo A. C., Feliciano C. P. 2011. Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. *Applied Radiation and Isotopes*, 69, 1374-1379.
- Dinkov D. 2018. Isolation and Identification of Bacteria in Flower Bee Pollen. *Walailak Journal of Science and Technology*, 15(3), 225-234.
- Dobbelaere W., Dirk D. G., Johan P. 2001. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32(4), 363-370.
- Duchateau M.J., Velthuis H.H.W. 1989. Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis and Applicata*. 51, 199-213.
- Estevinho L.M., Rodrigues S., Pereira A.P., Feás X. 2012. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 429-435.
- Evans J. D. y Schwarz R. S. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 30, 1-7.

- Evison S.E., Robert K.E., Laurenson L., Pietravalle S., Hui J., Biesmeijer J.C., Smith J.E., Budge G., Hughes W.O.H. 2012. Pervasiveness of parasites in pollinators. PLoS ONE, 7(1), 1-7.
- FAO. 2000. Food safety and quality as affected by animal feed stuff. Twenty second FAO Regional Conference for Europe, Portugal. Extraído el 17 de junio de 2016 desde: <http://www.fao.org/docrep/meeting/X4983e.htm>.
- Farkas J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food A review. International Journal of Food Microbiology, 44, 189- 204.
- Feás X., Vázquez-Tato M. P., Estevinho L., Seijas J. A. y Iglesias A. 2012. Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. Journal Molecules, 17, 8359-8377.
- Feng P., Weagant S. D., Grant M. A., Burkhardt W. 2002. Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual (BAM), chapter 4, 1-13.
- Fernández E. E. 2008. Microbiología e Inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. 915 p.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). 2007. Crop economic indicators by country. (<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>).
- Forsgren E. 2009. European Foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 103, 5-9.
- García-García D., Rojas-Mogoyón M. y Sánchez-Nieves J. 2006. Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Acta Biológica Colombiana, 11, 123–129.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 56, 501-511.
- Genersch E. 2009. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate, 103, 10-19.



- Gilliam M. 1979. Microbiology of Pollen and Bee Bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10, 269–274.
- Gilliam M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155, 1-10.
- Goewie E.A. 1978. Regulation of caste differentiation in the honey bee (*Apis mellifera* L.). Ph.D. Thesis, Agricultural University, Wageningen, Meded. Landb. Hogeschool, 78-157.
- González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A. y Jiménez, M. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal Food Microbiology*, 105, 1–9.
- Goulson D. 2003. *Bumblebees Their Behaviour and Ecology*. Oxford University Press. 240p.
- Goulson D., Lye G.C., Darvill B. 2008. Decline and conservation of bumblebees. *Annual Review Entomology*, 53, 191-208.
- Goulson D. y Hughes W. O. H. 2015. Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators. *Biological Conservation*, 191, 10-19.
- Goulson D., Nicholls E., Botias C. and Rotheray E. 2015. Combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers drives bee declines. *Science*, 347 (6229), 1-30.
- Graystock P., Goulson D. and Hughes W.O.H. 2014. The relationship between managed bees and the prevalence of parasites in bumblebees. *PeerJ2*: e522.
- Graystock P., Jones J. C., Pamminer T., Parkinson J. F., Norman V., Blane E. J., Rothstein L., Wäckers F., Goulson D., Hughes W.O.H. 2016. Hygienic food to reduce pathogen risk to bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 68-73.
- Graystock P., Yates K., Darvill B., Goulson D., Hughes W.O.H. 2013. Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114, 114-119.
- Harder L.D. y Barclay R.M.R. 1994. The functional significance of poricidal anthers and buzz pollination: controlled pollen removal from *Dodecatheon*. *Functional Ecology*, 8, 509-517.

- Heemert C.V., de Ruijter A., Eijnde J.V.D., Steen J.V.D. 1990. Year round production of bumblebee colonies for crop pollination. *Bee World*, 71(2), 54-56.
- Herbert E.W.J.R. 2000. Honey bee nutrition. In: Graham, J (Ed.). *The hive and the honey bee*. Dadant and Co.; Hamilton, IL. USA. 197-224 p.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984). Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International journal of systematic bacteriology*, 46(1), 270-279.
- Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., García-Palencia P., Meana A. 2007. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal Invertebrate Pathology*, 97, 76-78.
- Kalawate A. y Mehetre S. 2015. Isolation and characterization of mold fungi and insects infecting sawmill wood, and their inhibition by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 117,191-197.
- Katznelson H. y Robb J. A. 1962. The use of gamma radiation from cobalt-60 in the control of diseases of the honeybee and the sterilization of honey *Canadian Journal of Microbiology*, 8(2), 175-179.
- Keller I., Fluri P., Imdorf A. 2005. Pollen nutrition and colony development in honey bees. *Bee World*, 86(1), 3-10.
- Koch H. y Schmid-Hempel P. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (48), 19288-19292.
- Komosinska-Vassev K., Olczyk P., Justyna Kafmierczak J., Lukasz Mencner L., and Olczyk K. 2015. *Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application*. Hindawi Publishing Corporation, 2015, 1-6.

- Le Conte Y., Brunet J.L., McDonnell C., Dussaubat C., Alaux C. 2011. Interactions between risk factors in honey bees. *Recent Investigations into the Problems with our Honey Bee Pollinators*. Taylor & Francis Inc. 215-222p.
- Lemma J., André R. A., Rachel E. D., Fillet S.M.E., Blumer L., Matraia C. 1999. Radiação gama na conservação do suco natural de laranja. *Scientia Agricola*, 56(4), 1193-1198.
- Loper G.M. y Cohen A.C. 1987. Amino acid content of Dandelion pollen, a honey bee (Hymenoptera: Apidae) nutritional evaluation. *Journal of Economic Entomology*, 14, 14-17.
- Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sobre animales terrestres, 2008. Capítulo 2.2.2. 11p.
- Manual de producción de polen. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana (PNPCAA), Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). 38 p.
- Matilla H.R., Otis G.W. 2006. Effects of pollen availability and *Nosema* infection during the spring and division of labour and survival of worker honey bees (Hymenoptera:Apidae). *Environmental Entomology*, 35, 708-717.
- Medina F. C. A. 2014. Principales enfermedades que afectan a las abejas melíferas (*Apis mellifera*). Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Zacatecas "Francisco García Salinas". 27 p.
- Meeus I., de Graaf D. C., Jans K., Smagghe G. 2010. Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosometids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 107-115.
- Meeus I., Mosallanejad H., Niu J., de Graaf D.C., Wackers F., Smagghe G. 2014. Gamma Irradiation of pollen and eradication of Israeli acute paralysis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 4 p.
- Meeus I., Vercruyssen V., Smagghe. 2012. Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 172-174.

- Método para la identificación de MALDI TOF-MS Biotyper®. Disponible en: endotoxin and microbial detection ([www.criver.com/accugenix](http://www.criver.com/accugenix)).
- Michener D. C. 2000. The Bees of the World. Baltimore and London (The John Hopkins University Press). 913p.
- Murray T. E., Coffey M. F., Kehoe E., Horgan F. G. 2013. Pathogene prevalence in commercially reared bumblebees and evidence of spillover in conspecific populations. *Biological Conservation Journal*, 159, 269-276.
- Mutinelli F. y Baggio A. 2008. American Foul Brood Control Strategies: A Brief Review. National Reference Laboratory for Beekeeping, Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Italy. 11p.
- Mullin C. A., Frazier M., Frazier J. L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J. S. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS ONE*, 5, (3), e9754, 1-19.
- Natupol. 2017. Disponible en: [www.natupol.com/pollination-bumblebees/biology-bumblebees](http://www.natupol.com/pollination-bumblebees/biology-bumblebees). Consultado el 14 julio 2017.
- Nicholson S. W. y Human H. 2013. Chemical composition of the “low quality” pollen sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie*, 44, 144-152.
- Norma Mexicana NMX-FF-094-SCFI-2008. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-polen-(Pollinis). Especificaciones (cancela a IA NMX-FF094-1998-SCFI).
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

- Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- Olanya O. M., Annous B. A. y Taylor J. 2015. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* and gaseous chlorine dioxide on the survival of *Salmonella* entérica on tomates. *International Journal of Food Science + Technology*, 50(5), 1102-1108.
- Otterstatter M. C. y Whidden T. L. 2004. Patterns of parasitism by tracheal mites (*Locustacarus buchneri*) in natural bumble bee populations. *Apidologie*, 35, 351-357.
- Pereboom J.J.M. 2000. The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, 47, 11-20.
- Pernal S. F., Currie R. W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-yearold single pollen diets for honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31, 387-409.
- Plischuk S. y Lange C. E. 2012. *Sphaerularia bombi* (Nematoda: Sphaerulariidae) parasitizing *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) in southern South America *Parasitology Research*, 111, 947–950.
- Plischuk S., Meeus I., Smagghe G. y Lange C. E. 2011. *Apicystis bombi* (Apicomplexa: Neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 565–568.
- Plischuk S., Antunez K., Haramboure M., Graciela M. Minardi G.M. y Lange C.E. 2017. Long-term prevalence of the protists *Crithidia bombi* and *Apicystis bombi* and detection of the microsporidium *Nosema bombi* in invasive bumble bees. *Environmental Microbiology Reports*, 9(2), 169–173.
- Pridal A., Sedláček I. y Marvanová L. 1997. Microbiology of *Bombus terrestris* L. larvae (Hymenoptera: Apoidea) from laboratory rearing. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis S.M.Z. a Lesnické Univerzity V Brne*. 59-66.

- Pridal A. 2002. Effects of three bacteria on *Bombus terrestris* male larvae under laboratory conditions. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis S.M.Z. a Lesnické Univerzity V Brne*, 4, 35-46.
- Puig-Peña Y., del-Risco-Ríos C. A., Álvarez-Rivera V. P., Leiva -Castillo V. y García-Neninger R. 2012. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43 (1), 23-27.
- Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smaghe G., de Graaf D. C. 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to Winter mortality *PLoS ONE*, 8(8), 1-9.
- Rajkowski K. T. y Thayer D. W. 2000. Reduction of *Salmonella* spp. and Strains of *Escherichia coli* O157:H7 by Gamma Radiation of Inoculated Sprouts. *Journal of food protection*, 63(7), 871-875.
- Refai I. N., Aziz H., El-Far F. y Hassan A. A. 1996. Detection of Ochratoxin Produced by *A. ochraceus* in Feedstuffs and its Control by gamma Radiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 47, 7, 617-621.
- Roulston T.H. y Cane J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 187-209.
- Sachman-Ruiz B., Narvaez-Padilla V. y Reynaud E. 2015. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México. *Biological Invasions*, 17, 2043–2053
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1987. *Molecular Cloning a laboratory manual*. Second edition. CSHL Press, 1.25-1.37.
- Sandrin T. R., Goldstein J. E. y Schumaker E. 2012. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews*, 32, 188-217.
- Schmid-Hempel R. y Tognazzo M. 2010. Molecular Divergence Defines Two Distinct Lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), Parasites of Bumblebees. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 337-345.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2009. Plan Nacional de Agricultura Protegida.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana (PNPCAA), 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades Agropecuarias*, 199, 32 p.
- Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2015. Manual de Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) en la producción de miel. Tercera edición. 103p.
- Sedlow P. 2014. Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum*. American Society of Microbiology Press, 2(5), 1-14.
- Seeley T.D. 1985. *Honeybee ecology: a study of adaptation in social life*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Serra-Bonvehi, J. y Jordà-Escolá R. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 725-732.
- Singh R., Levitt A. L., Rajotte E. G., Holmes E. C., Ostiguy N., vanEngelsdorp D., Lipkin W. I., dePamphilis C. W., Toth A. L., Cox-Foster D. L. 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE*, 5(12), 1-16.
- Somerville D.C. y Nicol H.I. 2006. Crude protein and amino acid composition of honey bee collected pollen pellets from South-East Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46, 141-149.
- Torres R. A., Jones W. R. and Ayala B. 2013. Present and Potential use of as Managed Pollinators in Mexico. *Southwestern Entomologist*, 38(1), 133-148.
- Vanderzant C. y Splittstoesser D. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Third Edition. 1290p.

- Velthuis H.H.W. y van Doorn A., 2006. A century of advances on bumblebee domestication and the economic and environmental aspect of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37, 421-451.
- White T. J., Bruns T., Lee S. y Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322 In: eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York.
- Winter K., Adams L., Thorp R., Inouye D., Day L., Ascher J., Buchmann S. 2006. Importation of non-native bumblebees into North America: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumblebees from greenhouse crop pollination in Canada, Mexico and the United States. A white paper from the North American Pollination Protection Campaign (NAPPC).
- Yoneda M., Furuta H., Tsuchida K., Okabe K. y Goka K. 2008. Commercial colonies of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) are reservoirs of the traqueal mite *Locustacarus buchneri* (Acari: Podapolipidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43(1), 73-76.
- Yook Hong-Sun, Lim Seong-IL y Byun Myung-Woo. 1998. Changes in Microbiological and Physicochemical Properties of Bee Pollen by Application of Gamma Irradiation and Ozone Treatment. *Journal of Food Protection*, 61(2), 217-220.