Caracterización Microbiológica de la miel de *Melipona becheii* de Cuba.

Lic. Daimy Díaz Mena; Ing. Juan C. Pérez Morales; Lic. Daniel E. Borges, Lic. Dora Ma. Lorenzo, Luis Mendoza.

Estación Experimental Apícola

Carretera Wajay, Km 0, El Cano, La Lisa. Ciudad Habana. Cuba

Resumen

Los resultados obtenidos demuestran que para el caso de la miel de melipona los valores totales de microorganismos mesófilos viables se comportan con mayores valores que en el caso de valores reportados para la miel de melífera. Los valores totales en las muestras analizadas llegaron hasta 25000 ufc/g; en general los valores se manifiestan muy variados oscilando entre 23 ufc/g y 25000ufc/g, el valor promedio resultó de 3400 ufc/g, pero en ningún caso sobrepasó el valor límite permisible establecido en la Norma Cubana; para el caso del conteo de Hongos filamentosos, ocurre un comportamiento similar con respecto a la miel de melífera; para el caso de las muestras analizadas se obtuvieron en general valores mayores que llegaron hasta 200 ufc/g. El conteo total de levaduras viables resultaron mayores valores que los reportados para la miel de melífera, estando entre 10 ufc/g hasta 10000ufc/g, estando en algunos casos por encima de los valores permisibles.

El procesamiento estadístico utilizado resultó de la división en dos grupos entre las muestras, uno perteneciente a período lluvioso y otro período no lluvioso, manifestándose diferencias significativas entre ellos en cuanto a Conteo Total(para un nivel de significación de un 95%) y Conteo de Levaduras Viables (para un nivel de significación de 99%). Lo que demuestra la influencia de las condiciones climáticas en el aporte y desarrollo de la microbiota en la miel, sobre todo en el incremento de la presencia de levaduras en el período lluvioso.

Introducción

La miel presenta propiedades especiales para inhibir o matar a la mayoría de los microorganismos. Sin embargo unos cuantos tipos de ellos pueden persistir (algunos en estado latente) en la miel y pueden crecer algunos tipos de levaduras. Otros microorganismos pueden ser inoculados en la miel una vez cosechada. De manera que son microorganismos resistentes a la concentración de azúcares, acidez y carácter antimicrobiano de la miel (Snowdon J., 1999; Castrejón V., 1998; Popeskovic D., 1984; Molan P., 2001).

Los microorganismos juegan un papel importante al determinar la vida de anaquel o inocuidad de los alimentos. La información sobre microbiología en la miel es muy limitada, la mayor parte registrada proviene de compañías privadas. A medida que la miel sea utilizada de diferentes y nuevas maneras, se requerirá de un mayor entendimiento sobre que microbios es factible que estén presentes, de donde vienen y como pueden ser controlados.

Los antiguos mayas dieron el nombre Xunan kab a la única abeja que domesticaron (Melipona beecheii) de la que obtenían miel y cera, a esta especie se le llama vulgarmente abejas sin aguijón. Ambos productos formaron parte esencial de sus ceremonias religiosas. (Quesada et al, ; Ramírez J, 2003; Medellín M. S, 1990; González A., 1994; Ayala R.T, 1993).En Cuba esta es la especie que ha preexistido, además de la abeja europea Apis mellifera, de la cual se extrae la miel que actualmente se comercializa.

Para el caso de la miel de melipona existe aún menos información acerca de su microbiología, y en Cuba no están establecidas las normas para este tipo de miel. Debido a sus favorables propiedades el objetivo de este trabajo es justamente estudiar el comportamiento microbiológico de este valioso producto con vistas a poder establecer en el futuro cercano una norma que recoja las características de la miel de melipona cubana con el fin de que la misma se registre y reconozca como un complemento nutricional ó como un medicamento alternativo.

Materiales y Métodos

Con la finalidad de determinar el comportamiento higiénico sanitario de este tipo de miel y su posible aptitud para el consumo humano se realizaron los siguientes ensayos, según la Norma Cubana para Productos Alimenticios y Bebidas que se refiere en cada caso en la bibliografía.

NC 76-04-2, 1982; NC 76-04-3, 1982 y NC 76-04-1, 1982.

Los muestreos se realizaron en apiarios referidos en los datos de las muestras. La toma de muestra fue realizada directamente del toral utilizando jeringas estériles y desechables con aditamentos de silicona y depositadas en frascos estériles. En cada caso se rotuló con todos los datos disponibles.

No.	Muestra	Procedencia	Fecha colecta	Fecha análisis	No. En el frasco/No. registro
1	E5	EEA	Junio 2003	23-6-03	E5/23
2	E6	EEA	Junio 2003	23-6-03	E6/24
3	E7	EEA	Junio 2003	23-6-03	E7/25
4	E8	EEA	Junio 2003	23-6-03	E8/26
5	E1	EEA	Junio 2003	21-7-03	1/33
7	E9	EEA	Junio 2003	21-7-03	9/35
8	E11	EEA	Junio 2003	21-7-03	11/36
9	E1	EEA	Oct. 2003	23-10-03	1/40
10	E4	EEA	Oct. 2003	23-10-03	4/41
11	E5	EEA	Oct. 2003	23-10-03	5/42
12	E6	EEA	Oct. 2003	23-10-03	6/43
13	E7	EEA	Oct. 2003	23-10-03	7/44
14	E8	EEA	Oct. 2003	23-10-03	8/45
15	E11	EEA	Oct. 2003	23-10-03	11/46
16	E12	EEA	Oct. 2003	23-10-03	12/47
17	E1-R3	EEA	Marzo 2004	12-03-04	3
18	E3-R4	EEA	Marzo 2004	12-03-04	4
19	E4-R5	EEA	Marzo 2004	12-03-04	5
20	E5-R6	EEA	Marzo 2004	12-03-04	6
21	E6-R7	EEA	Marzo 2004	12-03-04	7
22	E7-R8	EEA	Marzo 2004	12-03-04	8
23	E8-R9	EEA	Marzo 2004	12-03-04	9
24	E11-R10	EEA	Marzo 2004	12-03-04	10
25	E12-R11	EEA	Marzo 2004	12-03-04	11
26	1-R49	Pinar Río	15-6-03	18-11-03	1/49
27	2-R50	Pinar Río	15-9-03	18-11-03	2/50
28	3-R51	Pinar Río	10-5-03	18-11-03	3/51
29	4-R52	Pinar Río	19-9-03	18-11-03	4/52
30	5-R53	Pinar Río	20-6-03	18-11-03	5/53
31	6-R54	Pinar Río	18-9-03	18-11-03	6/54
32	7-R55	Pinar Río	5-5-03	18-11-03	7/55
33	8-56	Pinar Río	18-9-03	18-11-03	8/56

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que para el caso de la miel de melipona los valores totales de microorganismos mesófilos viables se comportan con mayores valores que en el caso de la miel de melífera. Los valores totales en las muestras analizadas llegaron hasta 25000 ufc/g, valores

superiores por los reportados para el caso de la miel de melífera reportados por Snowdon en 1999; en general los valores se manifiestan muy variados oscilando entre 23 ufc/g y 25000ufc/g, el valor promedio resultó de 3400 ufc/g, similares a los descritos por La-Serna y col. en 1997, datos escritos en la Revista CONSUMER, 1999 indican que el conteo de mesófilos totales en mieles de melíferas se encuentran dentro de los aceptados por la normativa española (Tabla 1).

Resultaron varias muestras comprendidas en el valor potencial permisible para este indicador como las muestras E1, 6, 7, 9 que aparecen en la Tabla 1, pero en ningún caso sobrepasó el valor límite permisible establecido en la Norma Cubana.

Los valores superiores en cuanto a la microbiota total con características de microorganismos mesófilos aerobios pueden ser explicados debido al aporte que hacen las abejas de polen en este tipo de miel; de manera que la microbiota del polen puede incorporarse a la miel e incrementarla.

En cuanto al conteo de Hongos filamentosos, ocurre un comportamiento similar con respecto a la miel de melífera; para el caso de las muestras analizadas se obtuvieron en general valores mayores que llegaron hasta $2x10^2$ ufc/g, siendo reportados en la miel de melífera valores inferiores como los encontrados por Sowdon en 1999, aunque obtuvo resultados en algunos casos comprendidos en la potencia 10^2 ufc/g. En la compilación realizada por La-Serna y col. en 1997 se reportan especies de hongos relacionadas con la miel de melífera (Tabla1).

Los valores obtenidos en el conteo de levaduras viables son muy diferentes a los encontrados por estudios reportados en la literatura con respecto a la miel de melífera, Snowdon en 1999 obtuvo resultados dentro de la potencia 10^2, en ninguna de las muestras excede este valor; sin embargo los resultados observados por las muestras estudiadas abarcan valores desde 10 y hasta 10000ufc/g, con un valor promedio de 1369, como lo plasmado en la Tabla 1. La-Serna reportó en 1997 la presencia de levaduras del género *Sacharomyces*.

El incremento en los valores de conteo total de levaduras viables en las mieles de melipona es justificable debido a las características químicas de esta miel; la miel de melipona presenta valores de humedad relativa mayores que la miel de melífera. Valores de humedad aproximadamente de 16 % fueron reportados por Stefanini en 1984, valores similares obtuvieron Sauceda y col. en 1999 y Del Moral en igual año en miel de melífera; Jacinta Ramírez en el año 2003 reportó valores de contenido de agua en mieles de melipona de 20 %.

Los microorganismos coliformes no son admisibles en cuanto a su aparición en los alimentos para ser aptos para el consumo Humano y para el caso de las mieles una aparición de este tipo de

microorganismos deriva de una contaminación de origen secundario; en ninguna de las muestras analizadas se obtuvo coliformes por tanto en este parámetro está comprendido en las especificaciones de la Norma Cubana.

En la Tabla 2 aparecen los resultados de las muestras reincidentes por etapas; las épocas de castra fueron en los meses de junio del 2003, octubre de ese propio año y finalmente en marzo de 2004. El análisis estadístico utilizado abordó diferencias significativas en cuanto al número total de los conteos en los tres casos: mesófilos y levaduras, mostrándose mayores valores medios en el período lluvioso. La variabilidad fue más notable en el caso de los conteos en las levaduras viables, para un nivel de significación de 99%.

Para el conteo de mesófilos aerobios se obtuvo un decrecimiento en las etapas de colecta de las muestras entre los meses de junio a marzo, lo puede ser explicado a factores climáticos como la temperatura que favorece el crecimiento de este tipo de microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, teniendo en cuenta las fechas de colecta las muestras colectadas en el mes de junio es justificable que hayan desarrollado un mayor número de ufc/g mayor que en la época de octubre y a su vez en marzo, cuyo valor promedio fue de 8917ufc/g , en octubre de 3977ufc/g y en marzo de 111ufc/g. Las temperaturas en marzo son más frescas por tanto el crecimiento derivado de la microbiota incorporada a la miel será menor que en junio donde se manifiestan temperaturas favorables al crecimiento de estos microorganismos.

Para el caso de los Hongos ocurre de manera contraria, los hongos filamentosos presentan una temperatura óptima de crecimiento alrededor de 25 °C, de manera que se va a favorecer su crecimiento ante las temperaturas cercanas a esta en el mes de marzo las temperaturas al ser más bajas favorecen el crecimiento de estos microorganismos, justificándose el aumento observable en la tabla 2 de los resultados correspondientes a los conteos totales de hongos filamentosos desde junio hasta marzo.

Las levaduras viables expresaron un conteo total en aumento a favor de los momentos de colecta realizados, esto puede ser explicado debido además de el factor temperatura que este caso se manifiesta de manera similar a los hongos, pues las levaduras presentan una temperatura óptima de crecimiento igual; al factor floración que es favorecido en marzo donde las floraciones son abundantes; el aporte de néctar sería mayor y el aporte de polen superior en la misma medida, al ser esta especie polinizadora por excelencia el aporte de polen favorece muy positivamente el

desarrollo de levaduras; además en la época de octubre a abril se desarrolla un período lluvioso donde la humedad relativa aumenta lo que contribuye al aporte y crecimiento de levaduras.

Conclusiones

1. El comportamiento microbiológico de la miel de melipona se comportó con un número mayor que la miel de melífera en cuanto a Conteo Total de Microorganismos aerobios mesófilos.
2. El conteo de levaduras viables se comportó muy variables, en algunas muestras se manifestó por encima de los valores admisibles.
3. Las condiciones climáticas juegan un papel fundamental en la influencia de las características microbiológicas de la miel, lo que pudiera aportar a la explicación entre las muestras colectadas en diferentes épocas del año.
4. Los períodos de floración influyen en el comportamiento microbiológico de la miel de melipona, ya que el polen contribuye a la biodiversidad de microorganismos.
5. Resultaron diferencias significativas entre las muestras colectadas en los períodos, en el conteo total de microorganismos mesófilos viables.
6. En el conteo de levaduras se encontraron diferencias muy significativas entre las muestras respecto a las fechas de colecta.

Título en Inglés

Microbiology characterization of *Melipona becheii´s* honey from Cuba.

ABSTRACT

The total values of the microorganims in the honey of melipona were more than the reported values from bibliography of the meliferous honey. The values were till 25000cfu/g; but all the cases were inside of the admissible values for the Cuban Reglament. The total fungus values were till 200cfu/g, it were more than the reported values of the meliferous honey from literature and finally the total values of the yeast were superior too, it were among 10cfu/g and 10000cfu, due to some of the obtained values of yeast were out side of the admissible values of the Sanitary Cuban Reglament.

The statistic procedure resulted on two groups, there is a statistically significant difference between the mean Total Count of microorganims at the 95.0% confidence level. Although respect to the Total Count of Yeast the statistic procedure showed significant difference too but at the 99.0% confidence level. For that reason we can say that the environmet conditions can cause the increment of presence of microorganims in the honey, however of the chemical and other characterirtics like physicians.

Tablas

Tabla1. Resultados del comportamiento del control sanitario.

No	Muestra	Conteo Total	Conteo Hongos	Conteo Levaduras	Conteo coliformes
1	E5	10^3	<10	<10	ausencia
2	E6	$2x10^4$	$<10^2$	<10	ausencia
3	E7	$2.5x10^4$	$<10^2$	<10	ausencia
4	E8	$1.5x10^3$	<10	1.5x10	ausencia
5	E1	$5x10^3$	5x10	5x10	ausencia
6	E1a	$5x10^2$	<10	<10	ausencia
7	E9	$2x10^4$	<10	<10	ausencia
8	E11	$1x10^3$	<10	<10	ausencia
9	E1	$2x10^4$	5x10	$>10^2$	ausencia
10	E4	$1x10^4$	$1x10^2$	$>10^2$	ausencia
11	E5	$2.3x10^2$	$1x10^2$	$5x10^2$	ausencia
12	E6	$2.3x10^2$	$1x10^2$	<10	ausencia
13	E7	$4x10^2$	<10	$>10^2$	ausencia
14	E8	$1x10^3$	$1x10^2$	5x10	ausencia
15	E11	$2x10^3$	$2x10^2$	$5x10^2$	ausencia
16	E12	$2.3x10^2$	$2x10^2$	$>10^2$	ausencia
17	E1-R3	$2x10^2$	<10	$1x10^4$	ausencia
18	E3-R4	2.3x10	<10	$1x10^4$	ausencia
19	E4-R5	1x103	<10	$1x10^3$	ausencia
20	E5-R6	$1x10^2$	$2x10^2$	$2x10^3$	ausencia
21	E6-R7	$1x10^2$	<10	<10	ausencia
22	E7-R8	4x10	$1x10^2$	$3x10^2$	ausencia
23	E8-R9	$2x10^2$	$2x10^2$	$1x10^4$	ausencia
24	E11-R10	2.3x10	<10	$2x10^2$	ausencia
25	E12-R11	$2x10^3$	<10	$1x10^4$	ausencia
26	1-R49	4x10	$1x10^2$	<10	ausencia
27	2-R50	2.3x10	<10	2x10	ausencia
28	3-R51	2.3x10	<10	<10	ausencia
29	4-R52	4x10	3x10	<10	ausencia
30	5-R53	4x10	$1x10^2$	<10	ausencia
31	6-R54	4x10	<10	<10	ausencia
32	7-R55	2.3x10	<10	<10	ausencia
33	8-R56	$2x10^2$	$1x10^2$	<10	ausencia

Tabla 2. Comportamiento de los resultados de los conteos por épocas de castra.

Multiple Range Tests for Conteototal by Col_1

Method: 95,0 percent Duncan			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	11	5,15439	X
1	31	6,72289	X

Contrast	Difference
1 - 2	*1,56849

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Range Tests for Hongos by Col_1

Method: 95,0 percent Duncan

Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
1	31	3,54293	X
2	11	3,5954	X

Contrast	Difference
1 - 2	-0,0524676

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. There are no statistically significant differences between any pair of means at the 95,0% confidence level. At the top of the page, one homogenous group is identified by a column of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

Multiple Range Tests for Levaduras by Col_1

Method: 95,0 percent Duncan			
Col_1	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	11	2,51191	X
1	31	4,56425	X

Contrast	Difference
1 - 2	*2,05234

* denotes a statistically significant difference.

The StatAdvisor

This table applies a multiple comparison procedure to determine which means are significantly different from which others. The bottom half of the output shows the estimated difference between each pair of means. An asterisk has been placed next to 1 pair, indicating that this pair shows a statistically significant difference at the 95,0% confidence level. At the top of the page, 2 homogenous groups are identified using columns of X's. Within each column, the levels containing X's form a group of means within which there are no statistically significant differences. The method currently being used to discriminate among the means is Duncan's multiple comparison procedure. With this method, there is a 5,0% risk of calling one or more pairs significantly different when their actual difference equals 0.

BIBLIOGRAFÍA

Ayala, R., T. L. Griswold y S.H., Bullock. "The native Bees of Mexico" en Ramamoorthy, T.P., Bye, B., Lot, A. y Fa, J. (eds), Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution, Oxford University Press, Nueva York, Oxford, 1993, pp. 179-227.

La-Serna I. E; Méndez B; Gómez C. “La miel”. Aplicaciones de nuevas tecnologías en Mieles Canarias para su tipificación y control de la calidad. 1997b. p 30-31.

González Acereto, Jorge. "Acerca de la regionalización de la nomenclatura maya de las abejas sin aguijón (Melipona sp.) en Yucatán" en Revista de Geografía Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo. Núms. 5-6, julio de 1983-enero 1994.

Popol Vuh. 1973. Versión de Agustín Estrada Monroy. Editorial "José de Pineda Ibarra". Guatemala. 199 pp.

Medellín M. S., L. E. Campos, J. A. González, y G.V. Camara. Meliponicultura maya: perspectivas para su sostenibilidad, documento promocional, FMVZ, Universidad Autónoma de Yucatán, México, 1990.

Quezada, J. y J. González, "A preliminay study of the development of colonies of Melipona beecheii in traditional and rational hives". Journal of Apicultural Research. 33(3): 167-170

Ramírez J. “Las abejas, prodigio de la naturaleza”.Página web CONABIO, 24 de septiembre 2003.

Stefanini R., “Variabilidad y análisis estadístico de grupo de las mieles italianas”, 1984. Rev APIACTA, 41, p 110-112.

Revista CONSUMER , nº 27 noviembre 1999.

Snowdon J. A., 1999. “La microbiología de la miel- Cumpliendo con las Especificaciones del comprador”. Rev APITEC may/jun No 15 p 31-38.

Molan P., 2001. “¿ Por qué la miel es efectiva como medicina? La explicación científica de sus efectos”. Rev APITEC sept/oct No 29, p 3-7.

Popeskovic D., Dakic M., Buncic S y Ruzic P. “Investigación de las propiedades antimicrobianas de la miel”. Rev APIACTA 3, 1984, p 65-66.

Castrejón V. R.” Composición química, usos y propiedades de la miel, el polen y la jalea real”. Rev APITEC sept/oct, 1998, No12, p 23-27.

Norma Cubana 76-04-1, 1982. Determinación del Conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables.

Norma Cubana 76-04-2, 1982. Determinación de Hongos filamentosos y levaduras viables.

Norma Cubana 76-04-3, 1982. Determinación de microorganismos coliformes totales.