

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA MIEL. REVISION BIBLIOGRÁFICA

Microbial characteristic of honey. A Review

*Coll Cárdenas F¹, Villat C¹, Laporte G¹,
Noia M¹, Mestorino N²

1 Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; 2 Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118, CC 296, 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina. fcollcardenas@fcv.unlp.edu.ar

Resumen *El término calidad en el caso específico de la miel, está determinado por sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas. Internacionalmente, los criterios de calidad de la miel, son especificados mediante Regulaciones Standard, compiladas en el Codex Alimentario. En nuestro país, las características de los productos alimentarios argentinos, están reguladas a través del Código Alimentario Argentino que contiene la definición de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos que brindan garantía sanitaria. La miel es un producto muy estable respecto a los microorganismos debido a su composición; habitualmente sólo pueden encontrarse bacterias del género Bacillus y algunos hongos y levaduras.*

El objetivo de este trabajo fue realizar una recopilación bibliográfica sobre las características microbiológicas de la miel, en relación a su flora habitual y a los posibles agentes contaminantes y en base a éstos, la metodología empleada para diagnosticarlos y evaluar así, uno de los parámetros de calidad.

Abstract *The term quality in the specific case of honey is determined by its sensory characteristics, chemical, physical and microbiological. Internationally, the quality criteria of honey are specified by regulations Standards, compiled in the Codex Alimentarius. In our country, the characteristics of Argentinian foods are governed by Argentine Food Code which contains defining the parameters physicochemical and microbiological offered health guarantee. Honey is a very stable connection to microorganisms because of its composition; usually can only be found bacteria of the genus Bacillus and some fungi and yeast. The objective of this work was to make a compilation literature on the microbiological characteristics of honey, in relation to its normal flora and contaminants potential and based on these, the methodology used to diagnose and assess the case, one of the quality parameters.*

Palabras clave Miel; análisis microbiológico; contaminación microbiana; metodología; calidad.

Key Words Honey; microbiological analyses; microbial contamination; methodology; quality.

Introducción

El término calidad referido a los alimentos, engloba una serie de propiedades organolépticas características tales como la textura, color, sabor, etc. por las cuales este alimento resulta en un producto comestible, de aspecto atractivo, nutritivo y agradable al paladar, además de reunir una serie de propiedades funcionales que se exigen en la fabricación y comercialización de los productos alimenticios. En el caso específico de la miel, la calidad está determinada por sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas. Internacionalmente, los criterios de calidad de la miel, son especificados mediante Regulaciones Standard, compiladas en el Codex Alimentario (Bogdanov, S., 1999). En nuestro país, las características de los productos alimentarios argentinos aptos para el consumo, están básicamente reguladas a través del Código Alimentario Argentino que contiene, esencialmente, la definición de los parámetros físicoquímicos y microbiológicos que brindan, ante los consumidores, garantía sanitaria (Marconi, C. R., 1998).

Las características organolépticas de las mieles en general, dependen del contenido de azúcares totales, de su madurez y de la presencia de isoprenoides, los lupeoles, carotenos, ácido prefénico, alcaloides, flavonoides, ácidos orgánicos, glicósidos, aminoácidos, coumarinas, limonoides, melicianinas y simaroubalidanos, que aportan propiedades especiales a las mieles de abeja y que definen el flavor de este producto. Además, contiene una variedad de sustancias que pueden cumplir función de prebióticos. Estudios realizados en la Universidad de Michigan han demostrado que agregándole miel a productos tales como yogurt pueden favorecer el desarrollo, actividad y viabilidad de Bifidobacterias (National Honey Board, 2008).

Pero también, como todo producto de origen natural, las mieles de *Apis mellifera*, presentan una flora microbiana propia, al igual que el resto de los productos alimentarios, pero con un comportamiento microbiológico característico (Salamanca Grosso, G y col, 2001).

La miel es un producto muy estable respecto a los microorganismos, debido en especial a: 1) su baja actividad de agua; los valores de a_w (agua libre) de la miel de abeja se encuentran entre 0,56 y 0,62, valor que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas. Sin embargo, si la miel es diluida, el a_w alcanzado ya no sería efectivo para inhibir el crecimiento de los microorganismos y 2) su pH ácido (3.5 - 4.5); esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos y representa un importante

factor antimicrobiano (Bogdanov, S., 1997; Ramírez, J y col., 2003; Estrada, H y col, 2005). Además, se han identificado otras sustancias en la miel con propiedades antimicrobianas; diversos estudios han encontrado que la principal actividad antimicrobiana se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa (Estrada, H y col, 2005). También, los fitoquímicos, especialmente los flavonoides y ácidos aromáticos (Cooper, R.A y col, 2002; Rodríguez Montoya, MC, 2003; Estrada, H y col, 2005) y los antioxidantes fenólicos son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cooper RA y col, 2002). Por otro lado, aún cuando la presencia de lisozima en la miel no está bien esclarecida, en algunos reportes se menciona a ésta como uno de los antimicrobianos presentes en la miel (Subrahmanyam M y col., 2001; Molan PC. 2001; Cooper RA y col, 2002; Nevas, M y col, 2002). Pero, si bien estos factores actúan impidiendo la proliferación de los microorganismos, éstos pueden permanecer bajo la condición de viables durante largo tiempo, desarrollándose bajo circunstancias favorables (Salamanca Grosso, G y col, 2001). Además, aunque en términos sanitarios la miel pueda ser considerada como un alimento seguro, puede verse alterada debido a manipulaciones poco higiénicas durante la extracción, procesado, envasado o conservación (Rodríguez Montoya, MC, 2003).

El objetivo de este trabajo fue realizar una recopilación bibliográfica en base a las características microbiológicas de la miel, tanto en relación a su flora habitual como a los posibles agentes microbianos contaminantes y en base a éstos, la metodología empleada para diagnosticarlos y evaluar así, uno de los parámetros de calidad.

Microbiota habitual

En este orden, en la miel se encuentran bacterias del género *Bacillus*, que se presentan en estado esporulado, aunque en mieles recientes se pueden encontrar formas vegetativas. Se trata de microorganismos que no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana. Bajo algunas circunstancias pueden encontrarse algunos patógenos para las abejas, como *Bacillus larvae*, responsable de la Loque americana, y *Bacillus alvei*, agente relacionado con la Loque europea.

Los mohos que se encuentran en algunas mieles, pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Mucor*, se han reportado casos de contaminación con *Bettsya alvei* o moho del polen, se encuentran en la miel en forma de esporas, pero no crean problemas a no ser que la miel gane humedad en su superficie, por un

mal almacenamiento, pudiendo entonces desarrollarse y alterar el producto. Existe la posibilidad de contaminación de la miel a partir de hongos del tipo *Acosphaera apis* (Orden Acosphaerales), además de la acción de *Acosphaera major*.

En cuanto a las levaduras, éstas por presentar capacidad de evolucionar en un ambiente tan concentrado como los azúcares presentes en la miel, se conocen como osmófilos o sacarófilos, provienen de las flores del medio ambiente de donde se originan o manipulan las mieles, del equipo utilizado en las operaciones de extracción y sobre todo de las condiciones de envasado. Las flores se enriquecen de levaduras durante la polinización y cuando están en zonas donde existen frutos en descomposición. Estas levaduras, pertenecen al género *Saccharomyces*, y son las principales responsables de la fermentación de la miel, cuando las condiciones de humedad así, lo permiten (porcentaje de humedad cercano a 21%). Dentro de este género, las especies más frecuentes son *Saccharomyces bisporus variedad mellis*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii variedad osmophilus*. También se pueden encontrar levaduras banales; esta flora propia de la miel es introducida por la abeja en la colmena, con el néctar, polen o mielato, o por las mismas abejas durante las operaciones de limpieza, al vehicularlos sobre o dentro de su organismo (Salamanca Grosso, G, 2001). Otros agentes encontrados pertenecerían a los géneros *Schizosaccharomyces* y *Torula* (Migdal, W y col., 2000).

Microbiota contaminante

La miel puede contaminarse a partir de microorganismos provenientes del polen, del tracto digestivo de las abejas, del medio ambiente o del néctar en forma primaria o secundariamente, a partir de prácticas no totalmente higiénicas ocurridas durante la manipulación de la misma. En este caso, las fuentes de esta contaminación residen en la manipulación incorrecta de la miel, el uso de material con deficientes procedimientos de desinfección, locales no apropiados, incidencia del viento, presencia de insectos y permanencia de animales de compañía. Entre estos microorganismos existen diferentes géneros, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y algunos otros patógenos de las abejas.

Los agentes de contaminación primaria son de muy difícil control, en tanto los de contaminación secundaria pueden ser controlados mediante el empleo de buenas prácticas de manufactura (Finola, M y col, 2005).

Algunos estudios han demostrado que determinados géneros de *Salmonella*, son capaces de

resistir 34 días en la miel, cuando ésta se mantiene a 10° C, con lo que existiría un riesgo si el producto contaminado se emplea como ingrediente en la industria alimentaria o en el hogar.

La presencia de *Clostridium* Sulfito-reductores es también indicador de contaminación del producto (Collins, C.H. y col., 1999). También se han encontrado, aunque en bajos niveles, esporos de *C. botulinum* tipo G (Monetto, A y col., 1999). La presencia de esporos de este clostridio es en especial peligrosa para bebés y niños de corta edad (Centorbi, HJ y col., 1999), siendo causante del Botulismo infantil. En este sentido, la miel al presentar un alto contenido de azúcares (70±80%) y un pH entre 3.5 a 4.5, permite que estos microorganismos sobrevivan y una vez ingeridos por el niño, pueden pasar a forma vegetativa, multiplicándose y colonizando el colon, produciendo luego, la neurotoxina, causante de la enfermedad. Diversos estudios realizados, mostraron que entre un 7 a 13% de las mieles estudiadas, contaban con valores de 1 a 10 esporos/kg de *C. botulinum*. Debido a esta contaminación y la asociación epidemiológica de la ingestión de miel con el botulismo infantil, U.S. Food and Drug Administration, Centros de Control y Prevención de Enfermedades y la Academia Americana de Pediatría han alertado sobre la peligrosidad de este agente, aconsejando evitar la ingesta de mieles en niños menores de un año (Monetto, A y col, 1999).

En otros casos, también se han detectado otros microorganismos patógenos para el hombre como *Staphylococcus aureus* y *B. cereus*.

La legislación exige la ausencia total de microorganismos patógenos o toxinas patógenas, así como la ausencia de Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* y *Salmonella* – *Shigella*.

Higiene

La miel deberá estar exenta de sustancias inorgánicas u orgánicas extrañas a su composición tales como insectos, larvas, granos de arena y no exceder los máximos niveles tolerables para contaminaciones microbiológicas o residuos tóxicos (MERCOSUR/GMC/RES N°15/94).

Las prácticas de higiene para la elaboración del producto deben estar de acuerdo con el Reglamento Técnico MERCOSUR sobre las Condiciones Higiénico Sanitarias y Buenas Prácticas de Fabricación para Establecimientos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos (MERCOSUR/GMC/RES. N° 56/99).

Criterios microbiológicos

La miel deberá cumplir con las siguientes características microbiológicas (CAA, 1989):

Coliformes totales/g	n=5	c=0	m=0
<i>Salmonella spp</i> - <i>Shigella spp</i> /25g	n=10	c=0	m=0
Hongos y levaduras UFC/g	n=5	c=2	m=10
			M=100

n: número de muestras analizadas; *c*: número máximo de muestras con valores entre *m* y *M*; *m*: límite que separa los alimentos aceptables de los marginalmente aceptables; *M*: límite que separa los alimentos marginalmente aceptables de los inaceptables.

Muestreo

Se aplican las directivas de la Comisión del Codex Alimentarius, FAO/OMS, Manual de Procedimiento, Décima Edición (MERCOSUR/GMC/RES. N° 56/99).

Debe diferenciarse entre producto “a granel” y producto fraccionado (envase destinado al consumidor).

Extracción de muestras de miel “a granel”

Materiales necesarios:

- Taladros: son varillas de forma triangular.
- Frascos sacamuestras: recipiente de 35 a 40 ml de capacidad, fijado por medio de una abrazadera a una varilla de longitud suficiente para llegar al fondo del envase donde está contenida la miel.

El recipiente tiene un tapón móvil unido a una cuerda. El aparato se introduce cerrado a varias profundidades dentro del envase, donde se quita el tapón para llenarlo.

- Pipetas sacamuestras: tubos de 5 cm de diámetro por 1 m de largo, afinados en sus extremos a unos 15 mm de diámetro.

Obtención de muestras

a) Miel cristalizada: se realiza la extracción de muestra con la ayuda del taladro.

b) Miel líquida que puede ser homogeneizada: se homogeneiza y luego se toma la muestra con la pipeta sacamuestras hasta extraer aproximadamente 500 ml.

c) Miel líquida que no puede ser homogeneizada: con el frasco sacamuestras se extraen 10 muestras de 50 ml cada una, de diferentes niveles y en distintas posiciones.

Determinación de Mohos y Levaduras (Manual de BMP en miel, 1998) (Fig. 1)

Metodología:

La metodología se basa en las Normas Internacionales de A. P. H. A. (American Public Health Association) (Método 17.52, 1984)

10 g + 90 ml de agua peptonada 0,1%

Se siembra en placas en YGC Agar

Se incuba a 22°C 72 h.

Investigación de coliformes (Manual de BMP en miel, 1998) (Fig. 2)

Metodología:

La metodología se basa en las Normas Internacionales de ICMSF ((International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (Método 4, 1978).

10 g + 90 ml de agua peptonada 0,1%

Se siembra en placas en VRB Agar

Se incuba a 35°C 24 h.

Investigación de *Salmonella spp.* (Manual de BMP en miel, 1998) (Fig. 3)

Metodología:

La metodología se basa en las Normas Internacionales de A. P. H. A. (American Public Health Association) (Método 26.12, 1984).

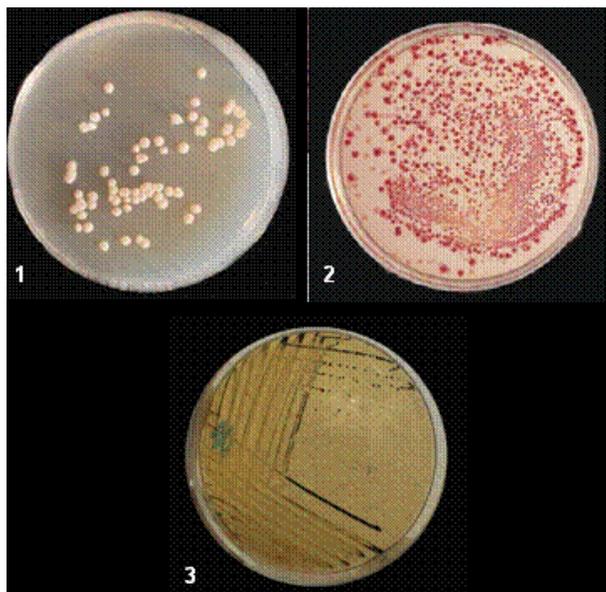
a) 25 g + 225 ml de caldo lactosado

Se incuba a 35°C durante 24 h.

b) 1 ml de a) + 10 ml de caldo RPVS

Se incuba 42-43°C durante 24 h.

c) Se siembra en placas, por agotamiento, una muestra de b) en SS Agar



Se incuba a 35°C 24 hs.

d) Pruebas bioquímicas: TSI, LIA, IMViC, Urea, Fermentación de azúcares, Lisina, Arginina, Ornitina, Malonato.

Fermentación. Pasteurización

Según el Reglamento Técnico MERCOSUR (MERCOSUR/GMC/RES. N° 56/99), la miel no debe presentar ningún indicio de fermentación. Dicha fermentación depende de la carga inicial de microorganismos, el tiempo de almacenamiento y la temperatura, y del contenido de humedad de la miel. La causa más importante que induce la fermentación es el aumento del contenido de agua libre (aw).

Las mieles con un contenido de aw menor del 0.17 no suelen fermentar.

La estabilidad de las mieles con un contenido de aw mayor, es función de su carga microbiana.

La miel pasteurizada, generalmente no fermenta debido a que se ha reducido su contenido microbiano, hasta que se abre el recipiente.

De este modo, si la miel tiene un aw bajo, tardará más en cristalizar y no fermentará, pudiéndose conservar por largo tiempo. En cambio, una miel de baja calidad tendrá que pasteurizarse para poderla conservar, a costa de perder sabor, aroma y color.

La pasteurización es un tratamiento térmico (78°-82°C, 2-3 min) que lleva a la licuación de la

miel, junto con una disminución de aromas y características organolépticas. Elimina levaduras y otros microorganismos, pero también destruye los cristales de glucosa, el 80% de la invertasa, el 25% de la amilasa y produce un oscurecimiento por caramelización de azúcares (reacción de Maillard). Además, supone un aumento de HMF (hidroximetilfurfural) y aunque se retrasa la cristalización, lo que se consigue finalmente es una cristalización fraccionada.

Conclusiones

Actualmente y cada vez más, la sociedad demanda alimentos de excelencia e inocuos para su salud, ya que intuye que existen determinados agentes microbianos y químicos que en forma accidental o inducida pueden contaminarlos. La miel, que desde siempre ha contado con un amplio reconocimiento como alimento puro y natural no puede quedar exenta de esta dinámica (Manual de BMP, México, 1998). Es por eso, que quienes participan en su producción, extracción, envasado y comercialización deben corresponder a la responsabilidad que implica intervenir en este proceso. Pero la aceptabilidad de un alimento no sólo viene determinada por sus características organolépticas. También influyen factores como los condicionantes culturales, la disponibilidad del producto y la economía familiar. Técnicamente, el consumidor poco conoce de las condiciones higiénicas y sanitarias de los alimentos, aspectos que son muy importantes pues su incumplimiento podría incidir seriamente en la salud de las personas. Es por ello que deben regularse en la medida de lo posible, las características físico-químicas, microbiológicas y sanitarias del producto, desde su producción hasta el momento de su consumo (Rodríguez Montoya, MC, 2003). El futuro de la industrialización de los productos de origen apícola se observa muy promisorio. Es por ello que será necesario establecer ciertas pautas referentes a los insumos y su calidad, reglas y dispositivos que deben normar la actividad, la importancia de la investigación científica de la flora apícola como proveedor de la materia prima para la miel y el hallazgo de tecnologías apropiadas, uso de cierto tipo de maquinaria y equipo.

Los análisis microbiológicos nos permitirán detectar problemas de manejo que interfieren con la producción de mieles tipificadas de alta calidad, y sus resultados nos otorgarán la base para proponer mejoras en la cosecha y la poscosecha de miel.

Bibliografía

1. APHA (1984) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd. Edition.

2. Bogdanov, S (1997) Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Center en http://www.apis.admin.ch/english/pdf/BeeProducts/%20AntibacterialInternet_e.pdf
3. Bogdanov, S (1999) Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission, *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel unter suchung und Hygiene* 90 (1999), pp. 108–125.
4. Código Alimentario Argentino. (1989) Metodología Analítica Oficial. Tomo I y II. Ed.
5. De la Canal y Asociados S.R.L., Buenos Aires, Argentina
6. Código Alimentario Argentino. MERCOSUR - GMC - RES N° 15/94. Resolución Mercosur sobre miel “Identidad y Calidad de miel”. SAGPyA.
7. Código Alimentario Argentino. MERCOSUR/GMC/RES. N° 56/99 (1999) Reglamento Técnico Mercosur. “Identidad y Calidad de la miel”. SAGPyA.
8. Centorbi, H.J.; Aliandro, O.E.; Demo, N.O.; Dutto, R.; Fernandez, R. y de Centorbi, O.N.P. (1999) First case of infant botulism associated with honey feeding in Argentina, *Anaerobe* 5 (1999), pp. 181–183
9. Collins, C.H; Lyne, P.M. y Grange, J.M. (1999). Collins and Lyne’s microbiological methods (7th ed.), Butterworth-Heinemann, Oxford (1999) pp. 213–221.
10. Cooper, RA; Molan, PC; Harding, K. (2002) The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Applied Microb.*; 93: 857-863.
11. Estrada; H; Gamboa, MM; Chaves, C y Arias, ML (2005). Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, Vol 55 – N° 2.
12. Finola MS., Lasagno MC y Marioli, JM (2005). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, Vol 100, Issue 4, 2007, 1649-1653.
13. ICMSF (1978) *Microorganisms in Foods*, 2nd. Edition
14. Manual BMP (1998) Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. Dirección de Promoción de la Calidad Alimentaria – SAGPyA
15. Manual BMP. (1998) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)- Coordinación General de Ganadería (CGG). Mexico.
16. Marconi, C. (1998) Implementación de sistemas de mejoramiento de la calidad en un establecimiento apícola. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA
17. Migdal., W; Owczarczyk, H.B; Kedzia, B; Holderna-Kedzia, E; Madajczyk, D (2000). Microbiological decontamination of natural honey by irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 57 (2000), pp. 285–288
18. Molan PC. (2001) Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2(1): 13-19
19. Monetto, A; Francavilla, A; Manca, L; Siravegnal, M; Fernandez, R. (1999) Study of Botulinum Spores in Honey. *Anaerobe* (1999) 5, 185±186, Article No. anae.1999.0267. Academic Press.
20. National Honey Board (2008) Honey and wellness. www.nhb.org
21. Nevas, M; Hielm, S; Lindstrom, M; Horn, H; Koivulehto, K; Korkeala, H. (2002). High prevalence of Clostridium botulinum types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol.*; 72:45-52.
22. Ramirez, J; Calderón, R; Ortiz, R; Sánchez, L. (2003) Manual de Apicultura. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional, Costa Rica. Tomo I; pp 44-77.
23. Rodriguez Montoya, MC (2003) Composición, calidad y consumo de miel en España. www.consumaseguridad.com
24. Salamanca Grosso, G; Henao Rojas, C; Moreno, I; Luna, A (2001). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. *Galeria Apícola virtual*. Apiservices.
25. Subrahmanyam, M; Archan, H; Pawar, S. (2001) Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters.*; XIV: 23-29.