



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) en la provincia de  
Loja, Ecuador**

Toaquiza Vilca, María Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología

M. Sc. Koch Kaiser, Alma Rosel

9 de septiembre del 2020



## Document Information

Analyzed document    urkund texto\_Toaquiza.docx (D78204358)  
                                  Submitted    8/26/2020 6:32:00 PM  
                                  Submitted by  
                                  Submitter email    fjflores2@espe.edu.ec  
                                  Similarity    4%  
                                  Analysis address    fjflores2.espe@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>W</b>	<p>URL: <a href="https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/938-todo-sobre-la-...">https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/938-todo-sobre-la ...</a>          Fetched: 8/26/2020 6:33:00 PM</p>	 1
<b>SA</b>	<p><b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis Paola Ruiz correc.docx</b>          Document Tesis Paola Ruiz correc.docx (D54441494)          Submitted by: jwron@espe.edu.ec          Receiver: jwron.espe@analysis.arkund.com</p>	 10

*Alma Rosel Koch Kaiser*

**M. Sc. Koch Kaiser, Alma Rosel**  
**DIRECTORA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) en la provincia de Loja, Ecuador**” fue realizado por la señorita **Toaquiza Vilca, María Belén** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de septiembre del 2020

ALMA ROSEL  
KOCH KAISER

Firmado digitalmente por ALMA ROSEL KOCH KAISER  
Módulo:  
DIR. de ALMA ROSEL KOCH KAISER -eHC  
e-CONFIRMACIÓN DIGITAL S.A. JURISDICCIONAL DE  
CERTIFICACIONES DE INFORMACIÓN  
Módulo: Entes Afiliados este documento  
Módulo:  
Fecha: 2020-09-14 20:35:05.00

.....  
**Mgs. Koch Kaiser, Alma Rosel**

C. C: 1708880792



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Toaquiza Vilca, María Belén**, con cédula de ciudadanía n° 0503120123, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) en la provincia de Loja, Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 9 de septiembre del 2020**

**Toaquiza Vilca María Belén**

C.C.:0503120123



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo, **Toaquiza Vilca, María Belén**, con cédula de ciudadanía n° 0503120123, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) en la provincia de Loja, Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 9 de septiembre del 2020**

**Toaquiza Vilca María Belén**

C.C.:0503120123

### **Dedicatoria**

Dedico el presente trabajo a la memoria de mi padre, Ricardo, por su amor a la familia, su ingenio y su capacidad de liderazgo. A mi madre, Delia, por ser la persona más importante en mi vida, quien ha luchado por sus hijos a pesar de todas las adversidades.

## **Agradecimientos**

Al apoyo de mi madre y mis hermanos durante todo este trayecto, quienes me han enseñado a ser una mejor persona cada día.

A mi tutora de tesis M. Sc. Alma Koch y al Dr. Jorge Ron Román Ph. D. por su dedicación, conocimientos, paciencia y motivación para culminar este trabajo de investigación.

Dra. María Augusta Chávez M. Sc., Lcda. Sarah Martin Ph. D. e Ing. Francisco Flores Ph. D. por brindarme su ayuda durante la carrera y en la ejecución de este proyecto.

Al ARES y a la Universidad de Lieja-Bélgica por el financiamiento del presente trabajo de titulación. Igualmente, a todos quienes contribuyeron en la realización del proyecto como: los meliponicultores de la provincia de Loja, los laboratoristas y tesistas del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Animal.

A mis amigos que me han apoyado incondicionalmente para alcanzar mis metas y ser parte de mi vida. A Paola, quien me ha enseñado a ver las cosas positivas incluso en las situaciones más complicadas, por darme la esperanza de encontrar la luz al final del túnel.

## Índice de contenidos

Informe del urkund.....	2
Certificado del Director .....	3
Responsabilidad de autoría .....	3
Autorización de publicación .....	4
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tabla .....	11
Índice de figuras .....	12
Listado de abreviaturas .....	13
Resumen.....	14
Abstract .....	15
Capítulo I- Introducción .....	16
Planteamiento del problema .....	16
Justificación .....	17
Objetivos del proyecto .....	18
<i>Objetivo general</i> .....	18
<i>Objetivos específicos</i> .....	18
Capítulo 2 – Marco teórico.....	20
Tribu <i>Meliponini</i> .....	20
Grupos de individuos de la colonia .....	21
Arquitectura del nido .....	22
Productos de las abejas sin aguijón.....	22
<i>Miel</i> .....	22
<i>Propóleos</i> .....	23

<i>Cerumen</i> .....	24
<i>Polen</i> .....	24
Microorganismos en la miel de abejas sin aguijón .....	25
<i>Hongos y levaduras</i> .....	26
<i>Aerobios mesófilos</i> .....	27
<i>Bacillus</i> .....	27
<i>Clostridium</i> .....	27
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
<i>Coliformes totales</i> .....	28
<i>Escherichia coli</i> .....	29
Criterios de calidad para la miel .....	29
Actividad antimicrobiana de la miel .....	31
<i>pH bajo</i> .....	31
<i>Concentración de azúcares</i> .....	31
<i>Actividad peróxido</i> .....	32
<i>Compuestos fenólicos</i> .....	32
<i>Metilglioxal</i> .....	32
<i>Abeja defensina-1</i> .....	32
Métodos para determinar la actividad antimicrobiana .....	33
<i>Métodos de difusión</i> .....	33
<i>Métodos de dilución</i> .....	33
Hipótesis .....	35
Capítulo III - Materiales y métodos .....	36
Ubicación y zona de estudio .....	36
Tamaño de la muestra .....	37
Recolección de muestras .....	39

	10
Fase de Laboratorio.....	40
<i>Cuantificación de microorganismos</i> .....	40
Hongos y levaduras.....	40
Aerobios mesófilos.....	40
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
<i>Escherichia coli</i> .....	41
<i>Identificación de microorganismos</i> .....	41
Bacilos esporulados Gram positivos.....	41
Recopilación bibliográfica.....	43
<i>Carga microbiana de la miel Apis mellifera y abejas sin aguijón</i> .....	43
<i>Actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón</i> .....	44
Análisis estadístico de resultados.....	44
Capítulo IV-Resultados y Discusión.....	45
Cuantificación de microorganismos.....	45
Identificación de bacilos esporulados en la miel de abejas sin aguijón.....	48
Criterios microbiológicos de la miel <i>Apis mellifera</i> .....	54
Revisión bibliográfica.....	59
<i>Actividad antimicrobiana de abejas sin aguijón</i> .....	59
Capítulo VI-Conclusiones y Recomendaciones.....	62
Conclusiones.....	62
Recomendaciones.....	63
Capítulo VII- Bibliografía.....	64
Capítulo VIII- Anexos.....	75

### Índice de tabla

<b>Tabla 1.</b> <i>Fuentes primarias de contaminación de la miel</i> .....	26
<b>Tabla 2.</b> <i>Requisitos microbiológicos de la miel de Apis mellifera</i> .....	30
<b>Tabla 3.</b> <i>Coordenadas geográficas de las zonas muestreadas en la provincia de Loja</i> .37	
<b>Tabla 4.</b> <i>Número de mieles muestreadas por comunidades</i> .....	38
<b>Tabla 5.</b> <i>Distribución de las muestras de miel según las parroquias muestreadas</i> .....	39
<b>Tabla 6.</b> <i>Frecuencia de los géneros de abejas sin aguijón productores de miel según el muestreo realizado para la provincia de Loja</i> .....	42
<b>Tabla 7.</b> <i>Frecuencia de los géneros de abejas sin aguijón productores de miel según el cantón de Pindal, Celica y Puyango</i> .....	43
<b>Tabla 8.</b> <i>Distribución del muestreo de miel de Scaptotrigona pectoralis por cada cantón</i> .....	43
<b>Tabla 9.</b> <i>Cuantificación de los microorganismos identificados en las muestras de miel en el cantón de Pindal 2018 y 2019</i> .....	46
<b>Tabla 10.</b> <i>Cuantificación de los microorganismos en la miel recolectada en los cantones de Celica y Puyango 2019</i> .....	47
<b>Tabla 11.</b> <i>Identificación de bacilos esporulados Gram positivos</i> .....	48
<b>Tabla 12.</b> <i>Correlación de los microorganismos presentes en la miel</i> .....	50
<b>Tabla 13.</b> <i>Prueba de Chi cuadrado (microorganismos en la miel versus período de muestreo)</i> .....	51
<b>Tabla 14.</b> <i>Prueba de Chi cuadrado (microorganismos en la miel versus cantón de muestreo)</i> .....	53
<b>Tabla 15.</b> <i>Estudios microbiológicos de la miel de Apis mellifera y abejas sin aguijón</i> .....	58

### Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Especies de abejas sin aguijón productoras de miel en la región sur del Ecuador</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> <i>Ubicación del muestreo de mieles de abejas sin aguijón en la provincia de Loja</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> <i>Porcentaje de microorganismos presentes en las muestras de miel</i> .....	49
<b>Figura 4.</b> <i>Microorganismos en miel según los períodos de recolección</i> .....	52
<b>Figura 5.</b> <i>Microorganismos en la miel de <i>Scaptotrigona pectoralis</i> según los cantones</i>	53

**Listado de abreviaturas**

CMI	Concentración mínima inhibitoria
ISO	Organización Internacional de Normalización
FDA	Administracion de alimentos y medicamentos
BAM	Manual Analítico bacteriológico

## Resumen

La miel de las abejas sin aguijón ha sido utilizada ancestralmente para diferentes fines curativos y como endulzante, pero no cuenta con normativas que respalden su calidad. La presente investigación tiene la finalidad de aportar información que ayuden a establecer requisitos microbiológicos para la miel de abejas sin aguijón. Las muestras de miel (n=31) fueron recolectadas en la provincia de Loja-Ecuador en un total de 13 comunidades, las cuales fueron recolectadas asépticamente y luego almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis. Se sembró las diluciones seriadas de cada miel en placas de conteo rápido y placas de medio agar para la identificación de microorganismos. Los resultados obtenidos muestran la ausencia de *Escherichia coli* y coliformes totales, y la presencia de aerobios mesófilos en el 52%, bacilos esporulados Gram positivos en 48%, hongos y levaduras en 35% y *Staphylococcus aureus* en 19%. El 38.7% de las muestras no cumplen con los criterios microbiológicos para miel de *Apis mellifera*. Aunque los componentes antimicrobianos de la miel pueden controlar el crecimiento de microorganismos, otros factores pueden generar un efecto negativo como: la alteración de las propiedades fisicoquímicas, tiempo de maduración y contaminación secundaria.

### Palabras clave:

- **ABEJAS SIN AGUIJÓN**
- **MIEL**
- **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **Abstract**

Honey from stingless bees has been used ancestrally for different curative purposes and as a sweetener, but there are no regulations to support its quality. The purpose of this research is to provide information to help establish microbiological requirements for stingless honey. The honey samples (n = 31) were collected in the province of Loja-Ecuador in a total of 13 communities, which were collected aseptically and then stored at 4 ° C until later analysis. Serial dilutions of each honey were seeded in rapid count plates and agar medium plates for the identification of microorganisms. The results obtained show the absence of *Escherichia coli* and total coliforms, and the presence of aerobic mesophiles in 52%, gram-positive spore-forming bacilli in 48%, fungi and yeast in 35% and *Staphylococcus aureus* in 19%; The 38.7% of samples do not meet the microbiological criteria for *Apis mellifera* honey. Although the antimicrobial components of honey can control the growth of microorganisms, other factors can generate a negative effect such as: the alteration of the physicochemical properties, maturation time and secondary contamination.

#### **Keywords:**

- **STINGLESS BEES**
- **HONEY**
- **ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

## Capítulo I- Introducción

### Planteamiento del problema

Las abejas sin aguijón pertenecen a la tribu *Meliponini* y a la familia Apidae, se encuentran distribuidas en regiones tropicales y neotropicales. Además de ser los principales polinizadores de estas zonas, son insectos eusociales y productores de miel (Michener, 2007).

La miel de las abejas sin aguijón posee propiedades fisicoquímicas diferentes a comparación de la miel de *Apis mellifera*, es decir, presenta mayor contenido de agua, mayor acidez, menor composición de azúcar y menor actividad enzimática (Nordin et al., 2018). Varios autores afirman que la miel de las meliponas es rica en compuestos fenólicos en comparación con otros tipos de miel, además de poseer propiedades antioxidantes, antibacterianas, anticancerígenas y antiinflamatorias (Ranneh et al., 2019).

La miel además de ser un edulcorante, se la emplea para el tratamiento de heridas superficiales de la piel, debido a sus componentes antibacterianos como alto contenido de carbohidratos, metilglioxal, peróxido de hidrógeno, abeja defensina-1, compuestos fenólicos y pH bajo (Ewnetu et al., 2013; Kwakman & Zaat, 2012). También se han registrado otros usos de la miel de las abejas sin aguijón como el tratamiento de cataratas oculares, pterigios e incluso resfriados (Arnold et al., 2018; Vit et al., 2016).

Es importante mencionar que la miel de las abejas sin aguijón no está incluida en estándares de calidad nacionales e internacionales, debido a la variabilidad de las propiedades fisicoquímicas según el origen geográfico, botánico y entomológico (Nordin et al., 2018; Souza et al., 2006). Sin embargo, países como Brasil, México, Costa Rica, Panamá, Trinidad y Tobago, Surinam y Venezuela han tratado de establecer parámetros de calidad siguiendo los lineamientos internacionales de la Comisión del Codex Alimentarius (Souza et al., 2006).

De la misma forma, la miel de abejas sin aguijón no tiene requisitos microbiológicos; pero países latinoamericanos poseen reglamentos y normas para evaluar su calidad microbiológica, como el reglamento técnico de Mercosur Resolución 56, la resolución 1057 de 2010-Colombia y la INEN 1572-Ecuador (Correa, 2015).

Además de los microorganismos indicadores de contaminación, la miel producida por las abejas puede presentar microorganismos asociados al ambiente, microbiota del insecto e incluso patógenos (Casalone et al., 2020; Grabowski & Klein, 2015). Es importante garantizar la inocuidad de la miel ya sea para fines medicinales o alimenticios, caso contrario, representa un riesgo para la salud de consumidor.

La miel de las abejas sin aguijón además de sus usos tradicionales, se la ha considerado para la elaboración de nuevos antibióticos debido a sus propiedades antimicrobianas (Boorn et al., 2010; Kwakman et al., 2010). Sin embargo, su actividad antimicrobiana puede ser cuestionada por la presencia de patógenos como *Clostridium* spp, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Pucciarelli et al., 2014).

### **Justificación**

Según Arnold et al. (2018), “países como México, Costa Rica y Brasil tienen la percepción de que hay menos abejas sin aguijón. De la misma forma, existen reportes de la disminución de la meliponicultura en países como México, Costa Rica, Brasil, Perú y Colombia”.

Las abejas sin aguijón son polinizadores silvestres de zonas tropicales y neotropicales, pero se encuentran amenazadas por la deforestación, monocultivos, fragmentación del bosque, agroquímicos, movilización de las colonias, cambios climáticos e introducción de polinizadores exóticos (Jaffé et al., 2019; Mayes et al., 2019). Según Mayes et al. (2019), para la conservación de especies pequeñas de las abejas sin aguijón se requiere de áreas de bosques intactos.

A través de la meliponicultura se puede impulsar a la conservación de especies de abejas sin aguijón. La venta de productos de colmena como polen, propóleos, cerumen y miel puede representar un beneficio económico para quienes cuidan de los polinizadores silvestres.

Mediante el presente proyecto se tiene como finalidad aportar sobre los requisitos microbiológicos de la miel de abejas sin aguijón, garantizando la inocuidad del producto al consumidor, para promover su comercialización e impulsar la meliponicultura.

Cabe destacar que en la meliponicultura se requiere mantener los nidos de algunas especies en bosques o selvas, proveer a las abejas de una diversidad de plantas o árboles nativos, no exponer a las meliponas a polinizadores exóticos que pueden tener enfermedades, no realizar traslados de los nidos, y no explotar a una sola especie en la producción de miel (Arnold et al., 2018).

Adicionalmente, se realizó una revisión bibliográfica sobre la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para comprender su potencial función como antibiótico.

## **Objetivos del proyecto**

### ***Objetivo general***

Analizar microbiológicamente la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) de la provincia de Loja.

### ***Objetivos específicos***

- Determinar la presencia de microorganismos en la miel de abejas sin aguijón y conteo de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra.
- Identificar los géneros bacterianos como *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Bacillus* mediante análisis bioquímico dependiente de cultivo de la miel.

- Comparar los resultados obtenidos con estudios previos nacionales e internacionales sobre la carga microbiana de la miel de abejas sin aguijón y miel de abejas del género *Apis* en calidad de alimentos humanos.
- Comparar estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de las mieles de abejas sin aguijón valorada por la concentración mínima inhibitoria.

## Capítulo 2 – Marco teórico

### Tribu *Meliponini*

Según Rasmussen & Cameron (2010), la tribu *Meliponini* es el grupo más grande de abejas sociales con más de 400 especies y 60 géneros, distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia.

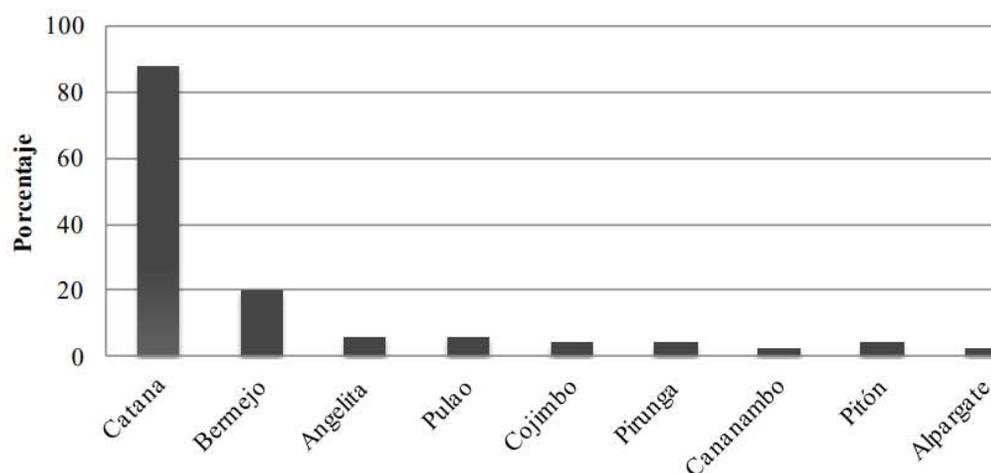
Según Michener (2007), la tribu *Meliponini* se caracteriza por ser abejas altamente sociales como las *Apis mellifera*, viven en colonias permanentes y tienen castas (reina, obreras y machos) morfológicamente diferentes. Sus colonias varían desde algunos centenares hasta más de 100 mil obreras dependiendo de la especie y desempeñan un papel importante como polinizadores de la vegetación nativa en América tropical (Falchetti & Nates-Parra, 2002; Michener, 2007).

En la región sur del Ecuador, en las provincias de Loja, El Oro y Zamora-Chinchipe se han registrado 89 especies de abejas sin aguijón, el 91% en remanentes forestales y el 9% en explotaciones rurales (J. Ramírez et al., 2012). En la figura 1 se aprecian las especies de abejas sin aguijón manejadas para la producción de miel al sur del Ecuador. Otra especie productora de miel no descrita en la figura 1, es *Geotrigona fumpennis*, la cual produce miel en nidos subterráneos, y los campesinos solo se limitan a su recolección (J. Ramírez et al., 2012).

Las especies generalmente empleadas para la meliponicultura en la región Sur del Ecuador son: catana (*Scaptotrigona* sp) y bermejo (*Melipona mimetica*). Mientras otras especies como angelita, pulao, cojimbo, pirunga, cananambo, pitón y alpargate presentan dificultades para su explotación, tales como distribución geográfica y la ausencia de la práctica de la meliponicultura en la zona amazónica (Martínez, 2015).

**Figura 1**

*Especies de abejas sin aguijón productoras de miel en la región sur del Ecuador*



*Nota:* Obtenido de (Martínez, 2015)

### **Grupos de individuos de la colonia**

La colonia está formada por la reina, las obreras y los zánganos. Arnold et al. (2018) describen que las actividades de las obreras son el forrajeo, limpieza, defensa del nido y alimentación de las larvas. Los zánganos, además de aparearse con la reina, intervienen en la termorregulación de la colmena ( Kwapong et al., 2010, citando en Arnold et al., 2018).

En una colonia de abejas sin aguijón pueden convivir la reina fecundada y varias reinas vírgenes. La abeja reina se diferencia de las obreras por poseer un abdomen voluminoso, es la única abeja en la colmena que puede poner huevos fertilizados (obreras) y huevos no fertilizados (zánganos) (Arnold et al., 2018).

En las abejas sin aguijón, al igual que en las *Apis mellifera*, una larva puede convertirse en abeja reina, si recibe mayor alimento en comparación a obreras o zánganos; a excepción del género *Melipona*, en quienes los factores genéticos determinan si una larva se desarrolla como abeja reina u obrera (Hartfelder et al., 2006).

## **Arquitectura del nido**

La función principal de los nidos es la protección de la cría, de los depredadores y del clima, y el almacenamiento de alimento recogido de las plantas. Los nidos de las abejas sin aguijón pueden ser expuestos, semiexpuestos u ocultos en cavidades. Las diferentes partes del nido están constituidas por cera, resinas, arena o pequeñas piedras, hojas secas, fibras o excremento de animal (mayor resistencia). El nido está constituido por la entrada, el batumen, el involucro, los panales de cría y los potes (Falchetti & Nates-Parra, 2002).

Según Arnold et al.( 2018), la presencia de una piquera en la entrada del nido puede ayudar a identificar la especie de abeja sin aguijón. La forma puede variar desde tubos proyectados hasta entradas simples sin agregación. La entrada de la colmena generalmente está controlada por una o varias abejas guardianas para evitar el ingreso de depredadores o enemigos.

El batumen es una capa endurecida que rodea el nido, constituido de cerumen con otros elementos como barro, arena o fibras de plantas. El involucro está formado por láminas de cerumen que envuelven a la cámara de cría. Mientras, los panales de cría tienen cerúmenes horizontales o en espiral, estas celdas son destruidas una vez que emerge la nueva abeja (Falchetti & Nates-Parra, 2002).

Simone-Feinstrom & Spivak (2010) describen a los potes de almacenamiento como macetas verticales de cerumen para almacenar polen y miel, los mismos que se ubican alrededor del involucro y la cámara de cría.

## **Productos de las abejas sin aguijón**

### ***Miel***

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN define a la miel como:

“sustancia dulce natural producida por abejas a partir del néctar de las flores o secreciones de parte vivas de las plantas o de excreciones de insectos

succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las mismas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias propias, y depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal para que madure” (NTE, 2016).

Según Souza et al. (2006), la calidad de la miel puede variar dependiendo de factores como la madurez lograda en los potes, temporada de cosecha, factores climáticos, ubicación geográfica, especie de abeja productora y otros elementos que afectan a la abundancia floral.

Las mieles están formadas por 80% de azúcares, 17% de agua y 3% de minerales, enzimas y ácidos. Los principales azúcares en la miel de las abejas sin aguijón son la fructosa y glucosa (Zulkhairi Amin et al., 2018).

Los minerales u oligoelementos presentes en la miel de las abejas sin aguijón son potasio, zinc, fósforo, calcio, magnesio, azufre, cobre, hierro y manganeso. Además, poseen vitaminas como: K, tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina (B3), ácido pantoténico (B5) y ácido ascórbico (C) (Rao et al., 2016).

Según Bogdanov et al. (2008), las principales enzimas de la miel son la diastasa, invertasa y glucosa oxidasa. La primera enzima se encarga de la descomposición del almidón y glucógeno en unidades de azúcar más pequeñas. La segunda enzima cumple con la descomposición de sacarosa en fructosa y glucosa. Mientras la tercera produce peróxido de hidrógeno y ácido glucónico de glucosa.

La miel posee compuestos aromáticos como flavonoides, ácidos fenólicos y derivados de ácidos fenólicos a los cuales se les atribuye las propiedades antimicrobianas (Zulkhairi Amin et al., 2018).

### ***Propóleos***

Los propóleos se componen de 50% de resina, 30% cera, 10% aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otras sustancias. La función principal de los propóleos

es controlar la temperatura, la luz y la humedad, también son anti-depredadores y antimicrobianos (Al-Waili et al., 2012; Borba et al., 2015).

En la investigación desarrollada por Casalone et al.(2020), en muestras de propóleos se identificó presencia de algunos géneros como *Bacillus*, *Paenibacillus* , *Lysinibacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. También afirmaron que la presencia de bacterias y hongos en los propóleos representan un gran potencial para combatir microorganismos dañinos.

### **Cerumen**

El cerumen es la mezcla de cera de abeja y resinas de plantas con la adición de la secreción mandibular de la abeja sin aguijón durante su elaboración (Simone-Feinstrom & Spivak, 2010). Según Temaru et al. (2007), la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón puede verse influenciada por la infiltración de compuestos fitoquímicos del cerumen a la miel durante su almacenamiento en macetas o potes.

En las macetas de cerumen o potes ocurren procesos de transformación física, biológica y química del néctar para la obtención de miel. En la transformación física se evapora gran parte del agua del néctar. A continuación, se produce la transformación biológica, que consiste en la fermentación del néctar por levaduras y bacterias simbióticas con la colmena.

Finalmente, la transformación química que es la secreción de enzimas de la glándula cefálicas para hidrolizar la sacarosa del néctar en fructosa y glucosa (Abd Jalil et al., 2017; Menezes et al., 2013).

### **Polen**

El polen de abejas son granos de polen recolectados por las obreras en el campo y recogidas en la entrada de la colmena. Mientras, el pan de abejas es polen fermentado utilizado como alimento para las larvas (Grabowski & Klein, 2015).

Mauriello et al. (2017) registraron la presencia los siguientes microorganismos en muestras de polen fresco: aerobios mesófilos, hongos y levaduras, bacterias del ácido láctico, Enterobacterias, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp. Además, identificaron que las condiciones de almacenamiento pueden afectar a la carga bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en muestras de polen congelado.

### **Microorganismos en la miel de abejas sin aguijón**

Las fuentes primarias de contaminación microbiana de la miel son aquellas que no se pueden controlar, principalmente proviene de la filosfera (flores, insectos que secretan mielada, fuentes de resinas y néctar), tracto digestivo de las abejas, colmena, polvo, aire y suelo (Grabowski & Klein, 2015)(Tabla 1). Mientras las fuentes secundarias comprenden la contaminación durante y después de la cosecha; puede presentarse por seres humanos, equipos, contenedores, viento, polvo, insectos, animales y agua (Ferrer Vera & Morales Petersen, 2005) .

En la contaminación primaria, cabe recalcar que la microbiota de las flores y polen corresponden a la del polvo y aire (Kacániová et al., 2009). Además, se debe considerar que la microbiota de las abejas se puede transferir a otros miembros de colmena, debido a que los productos de secreción son producidos dentro del tracto gastrointestinal como la miel y la jalea real (Grabowski & Klein, 2015).

Para evitar la contaminación secundaria se recomienda saneamiento estándar y buenas prácticas de manufactura considerando a la miel como un alimento (Snowdon & Cliver, 1996).

**Tabla 1***Fuentes primarias de contaminación de la miel*

<b>Fuente de contaminación</b>	<b>Principales microorganismos</b>
Suelo	<i>Clostridium</i> spp, <i>Corynebacterium</i> spp
Aire	<i>Bacillus</i> spp, <i>Clostridium</i> spp, <i>Enterobacter</i> spp, <i>Erwinia</i> spp, <i>Micrococcus</i> spp
Polvo	<i>Bacillus</i> spp, <i>Clostridium</i> spp, <i>Micrococcus</i> spp
Plantas y polen	<i>Bacillus</i> spp, <i>Bacillus circulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Citrobacter</i> spp, <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Enterobacter</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Erwinia</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Lactococcus</i> spp, <i>Listeria</i> spp, <i>Micrococcus</i> spp, <i>Staphylococcus sciuri</i> . <b>Fungi:</b> <i>Aspergillus</i> spp, <i>Penicillium</i> spp, <i>Pichia</i> spp, <i>Saccharomyces</i> spp.
Tracto gastrointestinal de la abeja	<i>Bacillus</i> spp, <i>Streptococcus</i> spp, <i>Clostridium</i> spp, <i>Citrobacter</i> spp, <i>Enterobacter</i> spp, <i>Enterobacteriaceae</i> spp, <i>Enterococcus</i> spp, <i>Erwinia</i> spp, <i>Escherichia coli</i> , <i>Flavobacterium</i> spp, <i>Klebsiella</i> spp, <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp, <i>Proteus</i> spp, <i>Pseudomonas</i> spp, <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <b>Fungi:</b> <i>Aspergillus</i> spp, <i>Candida</i> spp, <i>Penicillium</i> spp, <i>Saccharomyces</i> spp
Colmena	<i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Aspergillus</i>

*Nota:* Obtenido de (Grabowski & Klein, 2015; Snowdon & Cliver, 1996).

**Hongos y levaduras**

Los hongos y levaduras se pueden desarrollar en alimentos que presenten condiciones desfavorables para la proliferación de bacterias como: poco contenido de humedad, alto contenido de azúcar y bajas temperaturas de almacenamiento (Andrews, 1992). Como menciona Root & Root, en la miel se ha identificado la presencia de levaduras osmóliticas causantes de la fermentación (citado en Ferrer Vera & Morales Petersen, 2005).

Estos dos microorganismos afectan a las propiedades organolépticas del alimento generando su deterioro, y en algunos casos pueden producir micotoxinas. La alteración del sustrato también facilita la proliferación de bacterias patógenas (Andrews, 1992).

### ***Aerobios mesófilos***

Los aerobios mesófilos incluyen a todos los microorganismos capaces de crecer en presencia de oxígeno a una temperatura entre 30-40°C. Su recuento en condiciones estandarizadas estima la microbiota total, sin especificar los tipos de microorganismos (RENALOA, 2014).

El recuento elevado de aerobios mesófilos puede significar: contaminación secundaria de la miel durante la cosecha, envasado y almacenamiento; posible existencia de patógenos; y la inmediata alteración del producto (Grabowski & Klein, 2015; RENALOA, 2014).

### ***Bacillus***

Varios autores reconocen al género *Bacillus* como parte de la flora microbiana de la miel (Ngalimat et al., 2019; Salamanca Grosso et al., 2000; Snowdon & Cliver, 1996).

El género *Bacillus* está conformado por bacilos Gram positivos, formadores de esporas, pueden ser aerobios estrictos o facultativos, y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (García del Valle & Durán Zamudio, 1998).

Ngalimat et al. (2019) han reportado la presencia de especies del género *Bacillus* en productos de nido de la abeja sin aguijón *Heterotrigona itama* como: *Bacillus stratosphereus* PD6, *Bacillus amyloliquifaciens* PD9, *Bacillus subtilis* DB3, *Bacillus safensis* BD9 y *Bacillus amyloliquefaciens* PD9; los cuales poseen una actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas *in vitro*.

### ***Clostridium***

Los microorganismos indicadores de calidad para la miel son el grupo bacteriano *Clostridium* sulfito reductor, que incluyen a la especie *Clostridium perfringens*. Son bacterias anaerobias, Gram positivas, formadoras de esporas que tienen la capacidad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia de citrato férrico (RENALOA, 2014). Las esporas de *Clostridium* spp pueden sobrevivir en condiciones desfavorables como alta

concentración de azúcares y en la presencia de componentes antimicrobianos (Erkan et al., 2015; Mustafina et al., 2015).

*Clostridium perfringens* es el agente causal de intoxicaciones alimentarias y gangrena. Su identificación es más sencilla a comparación de otras especies, porque su crecimiento es rápido a 37°C y no posee flagelos (Grenda et al., 2018).

En la miel, el principal riesgo es la presencia de esporas de *Clostridium botulinum*, agente causante del botulismo infantil. Debido a que la flora intestinal de los bebés es poco desarrollada (anaerobia), se facilita la proliferación de las esporas clostridiales generando la toxicogénesis; las toxinas ingresan al torrente sanguíneo y se unen a las terminaciones neuromusculares (Grabowski & Klein, 2015).

Además de la identificación de *Clostridium* sulfito reductor, otra especie de gran interés es *Clostridium botulinum*, el agente causal del botulismo infantil en niños menores de un año. Aunque Boulanger et al.(2006), reporta que solo el 10% del botulismo infantil, en Estados Unidos está realmente asociado con la ingestión de miel.

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es un estafilococo patógeno, Gram positivo y anaerobio facultativo (Schelegel, 1997). Según Balasubramanian et al. (2019), *Staphylococcus aureus* puede residir e infectar una amplia gama de tejidos como la piel, tracto gastrointestinal, el corazón y huesos.

Esta bacteria es la principal causa de intoxicaciones alimentarias, resultado de la ingestión de enterotoxinas estafilocócicas. En alimentos procesados se puede destruir este microorganismo mediante procesos de calentamiento o secado (Andrews, 1992).

### ***Coliformes totales***

Andrews (1992) define al grupo de bacterias coliformes totales como “bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, no formadores de esporas, que fermentan

la lactosa en un caldo bilis de verde brillante con producción de ácido y gas en un 48 h a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ ".

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, móvil o inmóvil, anaerobio facultativo que forma parte de flora del intestino grueso de animales de sangre caliente (Acha & Szyfres, 2001). Esta bacteria es un indicador de la presencia de coliformes fecales o termorresistentes en alimentos (Andrews, 1992).

### ***Salmonella***

El género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, en su mayoría móviles (Acha & Szyfres, 2001). Según Andrews (1992), la presencia de *Salmonella* spp en alimentos para el consumo humano representa un peligro para la salud.

Según Acha & Szyfres(2001), las salmonelas de origen animal pueden generar una infección intestinal en el hombre desencadenado síntomas como dolores abdominales, náusea, vómito y diarrea dentro de 8 a 72 horas. En personas sanas, la recuperación surge en dos a cuatro días.

### **Criterios de calidad para la miel**

Se han desarrollado investigaciones para establecer criterios de calidad tanto en base a las propiedades fisicoquímicas como microbiológicas de la miel de diferentes especies de abejas sin aguijón. En el país se cuenta con la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1572 para requisitos de la miel de abejas *Apis mellifera*, donde se especifica que el conteo total de hongos y levaduras debe ser máximo de 100 UFC/g (NTE, 2016).

Según Correa (2015), los países de América Latina que poseen legislaciones con referencia a la calidad microbiológica de la miel son Costa Rica, Panamá, El Salvador, Bolivia, Chile y Colombia; pero solo los tres últimos países identifican la presencia de *Clostridium* sulfito reductor.

Además, existen otras normativas con referencia a la calidad de la miel en América Latina como la resolución del MERCOSUR y el Reglamento Técnico Centroamericano. La resolución del MERCOSUR se rige para países como Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, y establece criterios de calidad con respecto al conteo de hongos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella-Shigella* (MERCOSUR, 1995). Mientras el Reglamento Técnico Centroamericano se rige a países como El Salvador, Nicaragua, Honduras, y Costa Rica, establecido que el conteo máximo de *Clostridium* sulfito reductor no mayor a 100 UFC/g (COMIECO, 2009).

A la vez, existen legislaciones que especifican la ausencia de microorganismos patógenos y toxinas microbianas en la miel, como Norma mexicana-F-036-981(IMNC, 1981). A continuación, se presenta los requisitos microbiológicos de la miel de *Apis mellifera* según las normativas de países de América Latina (tabla 2).

**Tabla 2**

*Requisitos microbiológicos de la miel de Apis mellifera*

Agente microbiano	El Salvador NSO 7.19.01	Costa Rica RTCR 423	Colombia NTC 1273 Resolución 1057-10	Bolivia NB 38023	Perú NTS 071
Hongos y Levaduras (UFC/g)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	-
Hongos (UFC/g)	-	-	-	-	10 <sup>2</sup>
Levaduras (UFC/g)	-	-	-	-	-
Aerobios mesófilos (UFC/g)	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>
<i>Clostridium</i> sulfito reductor	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia	10 <sup>3</sup>
Coliformes totales (UFC/g)	Ausencia	<3NMP/g	<10	Ausencia	-
<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	Ausencia	-	Ausencia	-	-
<i>Salmonella- Shigella</i> /25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	-

*Nota:* Obtenido de (CONACYT, 2008; Correa, 2015; INBORCA, 2006; MAG-MEIC, 2006; MINSA/DIGESA, 2008).

### **Actividad antimicrobiana de la miel**

Aunque en el siglo XIX se mencionó sobre las propiedades antimicrobianas de la miel, en años recientes se ha realizado investigaciones para generar nuevos antimicrobianos y conocer la sinergia de sus componentes que inhiben el desarrollo de los microorganismos (Kwakman & Zaat, 2012).

En investigaciones para el desarrollo de nuevos antimicrobianos, se ha combinado la miel con diferentes sustancias para incrementar el espectro de inhibición y prevenir la aparición de cepas resistentes. Nishio et al., (2016) reportó que la interacción de las mieles de *Scaptotrigona bipunctata* y *Scaptotrigona postica* era sinérgica y presentaban actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas e incluso cepas resistentes a antibióticos.

También se ha registrado una interacción sinérgica entre la miel de la abeja sin aguijón con el extracto de ajo, reportando una CMI de 6.25% contra bacterias Gram positivas (100%) y Gram negativas (83.3%) (Anduaem, 2013).

A continuación, se explicará la función de los componentes antimicrobianos de la miel en el control de microorganismos.

#### ***pH bajo***

Según Souza et al. (2006), en las mieles de abejas sin aguijón se ha registrado un rango de pH entre 3.15 - 4.66. Para el desarrollo de microorganismos patógenos, se requiere de un pH entre 6 a 7; cuando el pH es muy bajo puede provocar la coagulación de proteínas celulares inactivando a los microorganismos. Hongos y levaduras pueden tolerar pH ácidos entre 2 y 3 (Barrerio & Sandoval, 2006).

#### ***Concentración de azúcares***

Según Efem et al.(1992), el factor de osmolaridad inhibe el crecimiento de bacterias. La alta concentración de azúcar de la miel se empareja con las moléculas de agua, así las bacterias carecen de agua para su desarrollo.

### ***Actividad peróxido***

Después de la adición de oxígeno, la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a D-Glucono- $\delta$ -lactona y peróxido de hidrógeno (Kwakman & Zaat, 2012). Los niveles de peróxido de hidrógeno en la miel dependen de dos factores: la cantidad de glucosa oxidasa añadida y la presencia de catalasa derivada del polen (Nolan et al., 2019).

El peróxido de hidrógeno es un biocida oxidativo, elimina los electrones de la estructura química, además requiere de altos niveles de polifenoles para mejorar el estrés oxidativo e inducir la degradación del ADN bacterial (Brudzynski et al., 2012).

### ***Compuestos fenólicos***

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se transmiten de las plantas a la miel e incluyen a flavonoides y ácidos fenólicos; se les atribuye propiedades antioxidantes (Bueno-Costa et al., 2016). Se han identificado compuestos fenólicos en la miel como la apigenina, la quercetina, ácido cafeico y la rutina (Pimentel et al., 2013).

### ***Metilglioxal***

El metilglioxal se ha identificado como principal componente antimicrobiano de la miel de Manuka (Zulkhairi Amin et al., 2018). A concentraciones de metilglioxal de 2 mM existe pérdida de todas las fimbrias y flagelos bacterianos, y se generan daños a las membranas celulares así como encogimiento (Nolan et al., 2019).

### ***Abeja defensina-1***

Es un péptido antimicrobiano identificado en la hemolinfa de la abeja y las glándulas hipofaríngeas. Además de ser un modulador de la respuesta inmune innata, presenta actividad contra hongos, levaduras, protozoos y bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su acción es limitada contra organismos resistentes a múltiples fármacos (Nolan et al., 2019).

## **Métodos para determinar la actividad antimicrobiana**

Las técnicas usualmente empleadas para estudiar la actividad antimicrobiana de la miel son: métodos de difusión y métodos de dilución. Antes de emplear cualquier método mencionado, se debe considerar el medio de cultivo y las cepas bacterianas. Los medios de cultivo más utilizados son agar Müeller-Hinton y agar tripticasa soya para bacterias (L. S. Ramírez & Marin Castaño, 2009). En cuanto a la cepa bacteriana, se deben utilizar cultivos frescos estandarizados a 0.5 según la escala de McFarland o su equivalente  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colonia (UFC/mL)(Forbes et al., 2009).

### ***Métodos de difusión***

Los métodos de difusión en agar se basan en el método de Kirby-Bauer, son ensayos cualitativos que permiten detectar la actividad antimicrobiana de sustancias polares y sus resultados se pueden interpretar como sensible, intermedio o resistente. Se basan entre la relación de la concentración de la miel y el halo de inhibición. Esta metodología se puede desarrollar por discos o pozos (L. S. Ramírez & Marin Castaño, 2009).

En esta técnica, los resultados pueden ser afectados por las siguientes variables: medio de cultivo, capacidad de difusión de la miel y período de incubación (Herrera, 1999).

### ***Métodos de dilución***

Los métodos de dilución en agar o caldo son métodos cuantitativos, los cuales consisten en probar una gradiente decreciente de la concentración de la miel contra inóculos bacterianos estandarizados (Herrera, 1999). Se los puede emplear para la valoración de la concentración mínima inhibitoria (MIC), se define como la concentración más baja de una sustancia para inhibir el crecimiento de un microorganismo; y la concentración mínima bactericida (MBC), definida como la mínima

concentración de una sustancia que mata el 99.9% de las bacterias de un inóculo inicial (Forbes et al., 2009).

Los métodos de difusión se pueden dividir en: dilución en agar, macrodilución y microdilución. La técnica de dilución en agar consiste en preparar cajas Petri con agar Müeller-Hinton a diferentes concentraciones de miel, las cuales serán sembradas con el inóculo estandarizado. Los resultados con respecto a la cepa son reportados como resistente o sensible a la concentración de miel. Mediante esta técnica se puede evaluar la CMI (L. S. Ramírez & Marin Castaño, 2009).

La técnica de macrodilución y microdilución poseen el mismo fundamento y su interpretación es semejante, aunque la microdilución presenta mayor sensibilidad. Mediante esta técnica se puede determinar valores de la CMI y CMB (Herrera, 1999).

En la microdilución se emplean placas plásticas, estériles, con 96 pozos y un fondo en forma de U en las cuales se preparan diferentes concentraciones de la miel y se mezclan con el caldo, que ha sido previamente inoculado con la cepa bacteriana (L. S. Ramírez & Marin Castaño, 2009). Después del periodo de incubación se reportan los resultados de la CMI y CMB. La CMI se puede identificar mediante la turbidez, lo cual indica la presencia o ausencia de crecimiento. Mientras CMB se reporta como el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) del microorganismo por mL de miel. Generalmente la CMB es una o dos diluciones más alta que CMI (Herrera, 1999; L. S. Ramírez & Marin Castaño, 2009).

**Hipótesis**

H0: Las muestras de miel de abejas sin aguijón recolectadas en la provincia de Loja no presentan contaminación con microorganismos como hongos y levaduras, aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli*.

H1: Las muestras de miel de abejas sin aguijón recolectadas en la provincia de Loja presentan contaminación por microorganismos como hongos y levaduras, aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli*.

### Capítulo III - Materiales y métodos

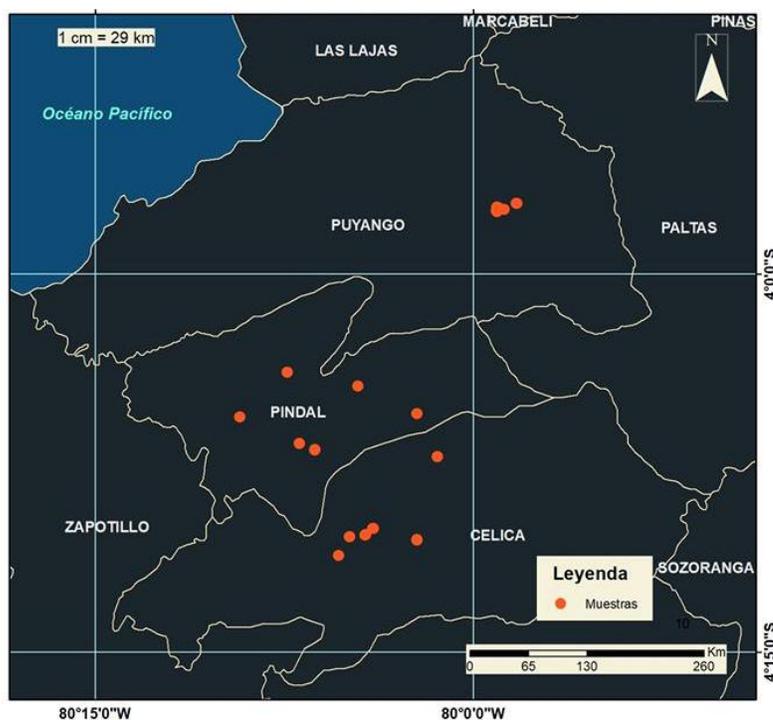
#### Ubicación y zona de estudio

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto de vinculación de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE denominado “Mejoramiento de la meliponicultura en el Ecuador a través de la investigación científica aplicada, transferencia de tecnología y capacitación”, dirigido por el Dr. Jorge Ron, PhD. que abordó como zona de estudio los cantones de Celica, Pindal y Puyango en la provincia de Loja, cuya ubicación geográfica se presenta la tabla 3 y figura 2.

En el periodo de agosto 2018 a marzo del 2019 se realizaron los muestreos en el cantón de Pindal, Celica y Puyango. El trabajo de laboratorio se realizó entre el período de septiembre 2019 a marzo del 2020.

#### Figura 2

*Ubicación del muestreo de mieles de abejas sin aguijón en la provincia de Loja*



**Tabla 3***Coordenadas geográficas de las zonas muestreadas en la provincia de Loja*

<b>Cantón</b>	<b>Parroquia</b>	<b>Comunidades</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	
Celica	Teniente Maximiliano Rodríguez	Algarrobillo	-4.173694, -80.063556	
		Las Huertas	-4.186136, -80.081358	
		El Faique	-4.175781, -80.041747	
	San Juan de Pozul	Naranjo	-4.120681, -80.049042	
Pindal	Pindal	Cristo del Consuelo	-4.105583, -80.175361	
		Panecillo	-4.116167, -80.105611	
	Milagros	Naranjito	-4.105608, -80.175369	
		El Toro	-4.098478, -80.172656	
	Doce de Diciembre	Doce de Diciembre	Doce de Diciembre	-4.072992, -80.085392
			Doce de Octubre	-4.068594, -80.119114
			Curiachi	-4.054861, -80.115508
Chaquinal		Caminuma	-4.047489, -80.036653	
Puyango	El Arenal	Arenal	-4.001303, -79.972092	

*Nota:* Obtenido de (Guaita, 2019)

### **Tamaño de la muestra**

Para estimar el número de nidos a muestrear entre los cantones de Celica, Pindal y Puyando, se consideró al número total de nidos entre estos cantones como una población infinita. Se aplicó la siguiente ecuación (López-Roldán & Fachelli, 2015):

$$n = \frac{(z_{\alpha/2})^2 pq}{E_p^2}$$

Se consideró un supuesto de máxima incertidumbre en que la proporción de nidos que poseían miel (p) y la proporción que no la poseían (q), tenían un valor de 0.5.

**n:** Número de nidos muestreados.

**N:** Número total de nidos.

$z_{\alpha/2}$ : Coeficiente del nivel de confianza al 95%, igual a 1.96.

**E<sub>p</sub>**: Error muestral esperado. Se consideró un valor del 20% porque no se realizó un muestreo de todas las parroquias de los cantones y se desconoce el número total de nidos por cantón.

Aplicando los valores descritos anteriormente se resolvió la ecuación y se obtuvo un total de 24 nidos a ser muestreados. Sin embargo, se realizó un muestreo de 31 muestras de miel, entre 13 comunidades.

### 2.1. Muestreo en la provincia de Loja

Se recolectó un total de 31 muestras entre 13 comunidades, distribuyéndose entre Celica (4 comunidades, 8 muestras), Pindal (8 comunidades, 15 muestras) y Puyango (1 comunidad, 8 muestras). En la tabla 4 se presenta las muestras recolectas por comunidades.

**Tabla 4**

*Número de mieles muestreadas por comunidades*

Año	Cantón	Parroquia	Comunidades	Meliponarios	Número de Nidos	Número de muestras	
2018	Pindal	Pindal	Cristo del Consuelo	1	8	3	
			Naranjito	1	7	3	
			Milagros	1	3	1	
		Doce de Diciembre	Doce de Diciembre	Milagros	1	1	0
				Doce de Diciembre	1	2	2
				Doce de Octubre	1	1	1
				Curiachi	1	3	3
2019	Pindal	Pindal	Panecillo	1	2	1	
		Chaquinal	Caminuma	1	2	1	
2019	Celica	Teniente	Algarrobillo	2	5	4	
			Maximiliano	Las Huertas	1	1	1
		Rodríguez	El Faique	1	3	1	
		San Juan de Pozul	Naranjo	1	3	2	
2019	Puyango	El Arenal	Arenal	6	13	8	
Total				20	54	31	

En la tabla 5 se aprecia que de 54 nidos visitados se muestreo el 57% (n=31/54), debido a que en la recolección de marzo 2019 habían nidos que no poseían miel, porque habían sido cosechados en meses recientes.

**Tabla 5**

*Distribución de las muestras de miel según las parroquias muestreadas*

Cantón	Parroquia	Número de meliponarios	Número de nidos	Número de nidos muestreados	Porcentaje de distribución de la muestra (%)
Pindal 2018	Pindal	2	15	6	40
	Milagros	2	4	4	100
	Doce de Diciembre	3	6	6	100
Pindal 2019	Pindal	1	2	1	50
	Chaquinal	1	2	1	50
Celica 2019	Teniente	4	9	6	67
	Maximiliano Rodríguez				
	San Juan de Pozul	1	3	2	67
Puyango 2019	El Arenal	6	13	8	62
	TOTAL	20	54	31	57

### **Recolección de muestras**

En la extracción de miel de las abejas sin aguijón, se utilizó una pinza estéril para abrir los potes, luego se succionó la miel con la ayuda de una pipeta Pasteur desechable y se colocó la miel en frascos estériles con tapa rosca (volumen de capacidad de 100 mL). A continuación, se rotuló de la siguiente manera: HxNyEM- Fecha (H: Hacienda, x: número de hacienda, N: Nido, y: Número de nido, M: Miel).

Finalmente, los frascos fueron almacenados en un termo con bloques de hielo hasta ser transportados al laboratorio, lugar donde se los almacenó a 4°C para su posterior procesamiento.

## **Fase de Laboratorio**

El procesamiento de muestras se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal y en el laboratorio de Microbiología de la Carrera de Ingeniería de Biotecnología en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en Salgado - Ecuador.

### ***Cuantificación de microorganismos***

Se pesó 1 g de miel y se disolvió en 9 mL de agua peptonada al 0.1% (suspensión madre), luego se homogenizó con ayuda de un agitador vortex (Pucciarelli et al., 2014). A continuación, se procedió con los siguientes análisis microbianos:

#### **Hongos y levaduras**

Se sembró 1 mL de la dilución madre o decimal de miel en placas de conteo de hongos y levaduras (MC-Media Pad) y se incubó a 22°C durante 3 a 5 días. Se contabilizaron las colonias de color rojo y se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC/g) (Sigma-Aldrich, 2020).

#### **Aerobios mesófilos**

Se tomó 1 mL de la dilución decimal de la miel y se colocó en placas de conteo para aerobios mesófilos (MC-Media Pad), se incubó a 35°C durante 48 horas. Se contabilizaron las colonias de color rojo o negro y se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC/g) (Sigma-Aldrich, 2020).

#### ***Staphylococcus aureus.***

Se colocó 1 mL de la dilución decimal de la miel en placas de conteo para *Staphylococcus aureus* (PetriFilm 3M) y se incubó a 35°C durante 24 horas. Se contabilizaron las colonias de color rosa y se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC/g) (PetriFilm 3M, 2014).

#### **Coliformes totales**

Se sembró 1 mL de la dilución decimal de la muestra de miel en placas para conteo de coliformes totales (MC-Media Pad) y se incubó a 35°C por 24 horas. Se

contabilizaron las colonias celestes y se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC/g) (Sigma-Aldrich, 2020).

### ***Escherichia coli***

Se tomó 1 mL de la dilución decimal de la miel y se colocó en placas para conteo de coliformes totales (MC-Media Pad) y se incubó a 35°C durante 24 a 48 horas. Se contaron las colonias de color morado o azul marino y se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de miel (UFC/g) (Sigma-Aldrich, 2020).

### ***Identificación de microorganismos***

#### **Bacilos esporulados Gram positivos**

Se realizó la siembra superficial de 100 µL de la dilución decimal de la miel en placas de agar nutriente, y se incubó a 36°C por 24 horas. También se realizó la activación de las diluciones decimales a 70 o 80°C por 10 minutos, y se las enfrió inmediatamente con agua por otros 10 minutos, y se sembró en placas de agar nutriente durante 72 horas a 35°C (Fernández et al., 2017).

Para la identificación morfológica, se realizó la tinción Gram de las muestras que presentaron crecimiento. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de bacilos esporulados Gram positivos.

## **2.2. Agrupación de las muestras de miel según el género**

Se clasificó a las muestras de miel según los géneros de las abejas sin aguijón, de acuerdo a la información proporcionada por el registro de muestreo y los trabajos de titulación de Pachacama (2020) y Palacios (2020) sobre la identificación molecular y morfometría geométrica de abejas sin aguijón de la provincia de Orellana y Loja.

Con respecto a las muestras de miel recolectadas entre los cantones de Celica, Pindal y Puyango, se identificó que estas eran producidas por especies de los géneros: *Scaptotrigona* (61.3%, n=19/31), *Melipona* (12.9%, n=4/31), *Nannotrigona* (6.5%,

n=2/31), *Frieseomelitta* (3.2%, n=1/31), *Oxytrigona* (3.2%, n=1/31), *Paratrigona* (3.2%, n=1/31) y 3 especies no identificadas (9.7%, n=3/31) (tabla 6).

**Tabla 6**

*Frecuencia de los géneros de abejas sin aguijón productores de miel según el muestreo realizado para la provincia de Loja*

Género	Frecuencia	
	Absoluta	Relativa
<i>Scaptotrigona</i>	19	0,61
<i>Melipona</i>	4	0,13
<i>Nannotrigona</i>	2	0,06
<i>Paratrigona</i>	1	0,03
<i>Oxytrigona</i>	1	0,03
<i>Frieseomelitta</i>	1	0,03
Especie no identificada 1	1	0,03
Especie no identificada 2	1	0,03
Especie no identificada 3	1	0,03

Las muestras de miel producidas por abejas del género *Scaptotrigona* presenta una mayor proporción con respecto al muestreo realizado en cada cantón: en Pindal se identificó en 46.7%( n=7/15), en Celica y Puyango en el 75% (n=6/8). También se recolectó muestras de miel producidas por abejas del género *Melipona* procedentes de los cantones de Pindal y Celica, mientras las muestras de miel del género *Nannotrigona* se cosecharon en los cantones Pindal y Puyango.

En el cantón Pindal se concentran las muestras de miel de diferentes géneros como *Scaptotrigona*, *Melipona*, *Nannotrigona*, *Oxytrigona*, *Frieseomelitta* y 3 especies no identificadas. En la tabla 7 se presenta la frecuencia del número de muestras de miel de los géneros según los cantones muestreados.

**Tabla 7**

*Frecuencia de los géneros de abejas sin aguijón productores de miel según el cantón de Pindal, Celica y Puyango*

<b>Cantón</b>	<b>Género</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia relativa</b>
Pindal	<i>Scaptotrigona</i>	7	0,467
	<i>Melipona</i>	2	0,133
	<i>Oxytrigona</i>	1	0,067
	<i>Frieseomelitta</i>	1	0,067
	<i>Nannotrigona</i>	1	0,067
	Especie no identificada 1	1	0,067
	Especie no identificada 2	1	0,067
	Especie no identificada 3	1	0,067
Celica	<i>Scaptotrigona</i>	6	0,75
	<i>Melipona</i>	2	0,25
Puyango	<i>Scaptotrigona</i>	6	0,75
	<i>Nannotrigona</i>	1	0,125
	<i>Paratrigona</i>	1	0,125

En la tabla 8 se presenta la distribución del número de muestras de miel correspondientes a la especie *Scaptotrigona pectoralis* según el número de muestras total por cada cantón.

**Tabla 8**

*Distribución del muestreo de miel de Scaptotrigona pectoralis por cada cantón*

<b>Cantón</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia relativa</b>
Pindal	5	33.33
Celica	4	0.50
Puyango	4	0.50

### **Recopilación bibliográfica**

#### ***Carga microbiana de la miel Apis mellifera y abejas sin aguijón***

Se recopiló información sobre el análisis microbiológico de la miel de abejas sin aguijón y abejas *Apis mellifera* en buscadores de internet como Google académico, Pub med y COBUEC, de los últimos 10 años a nivel de América Latina. Se consideraron parámetros como: tipo de abeja, ensayos microbiológicos para la detección de aerobios mesófilos, hongos y levaduras, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito reductor y *Salmonella* en muestras de miel.

A continuación se contabilizó el número de muestras de miel que presentaron un conteo superior a 100 UFC/g de hongos y levaduras, más de  $10^4$  UFC/g de aerobios mesófilos, un recuento superior de  $10^2$  UFC/ g de *Clostridium* sulfito reductor y la presencia de coliformes o *Escherichia coli* en muestras de miel.

#### **Actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón**

Se investigó sobre ensayos que evalúan la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón en bases de datos como Pub med, Google académico y COBUEC, a nivel de América Latina durante los últimos 15 años. Se consideraron los siguientes parámetros como: concentración mínima inhibitoria (CMI), métodos de dilución en caldo, género de abejas sin aguijón estudiadas en el presente estudio y la actividad contra las cepas de *Escherichia coli* ATCCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

#### **Análisis estadístico de resultados**

En esta investigación se analizaron los resultados obtenidos mediante pruebas no paramétricas como: pruebas de Chi cuadrado de dependencia y la correlación de Spearman.

## Capítulo IV-Resultados y Discusión

### Cuantificación de microorganismos

Para el conteo de unidades formadoras de colonias por gramo de miel, se realizó la siembra de dilución madre de cada muestra de miel en placas de conteo de aerobios mesófilos, hongos y levaduras, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En la identificación de coliformes, en algunas muestras de miel se observó la tinción de la almohadilla de inoculación de color celestes o celeste verdoso, es decir, se detectó la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. La tinción de color celeste en las placas no se reportó como presencia de coliformes en la miel.

En las muestras de miel de abejas sin aguijón de la provincia de Loja no se registró la presencia de coliformes totales ni *Escherichia coli*. En las quince muestras de miel provenientes del cantón Pindal, se registró la presencia de mesófilos aerobios el 53% (n=8/15), hongos y levaduras en 67% (n=10/15) y *Staphylococcus aureus* en 13% (n=2/15). En las ocho muestras provenientes del cantón de Celica no se detectó la presencia de hongos y levaduras, pero se registró la presencia de mesófilos aerobios y *Staphylococcus aureus* en 88% (n=7/8) y 13% (n=1/8), respectivamente. En ocho muestras de miel del cantón Puyango se detectó *Staphylococcus aureus* en 38% (n=3/8), y la presencia de hongos y levaduras, y mesófilos aerobios en una muestra de miel perteneciente al género *Paratrigona*.

En la tabla 9 y 10 se presentan los resultados de la cuantificación de aerobios mesófilos, hongos y levaduras y *Staphylococcus aureus* en las muestras de miel de acuerdo a las parroquias muestreadas.

**Tabla 9**

*Cuantificación de los microorganismos identificados en las muestras de miel en el cantón de Pindal 2018 y 2019*

Cantón	Parroquia	N°	Géneros	Aerobios mesófilos		Hongos y levaduras		<i>Staphylococcus aureus</i>	
				Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo
Pindal 2018	Pindal	1	<i>Oxytrigona</i>	1(100%)	<10	1(100%)	20	1(100%)	<10
		2	<i>Scaptotrigona</i>	2(100%)	10	2(100%)	20-140	2(100%)	<10
	Milagros	2	<i>Melipona</i>	2(100%)	20-110	1(50%)	<10	2(100%)	<10
						1(50%)	10		
		1	<i>Scaptotrigona</i>	1(100%)	120	1(100%)	10	1(100%)	<10
		1	No identificada sp1	1(100%)	<10	1(100%)	MNPC	1(100%)	<10
	Doce de Diciembre	2	<i>Scaptotrigona</i>	1(50%)	<10	2(100%)	20-80	1(50%)	<10
				1(50%)	80			1(50%)	110
		1	<i>Frieseomelitta</i>	1(100%)	50	1(100%)	70	1(100%)	<10
		1	<i>Nannotrigona</i>	1(100%)	<10	1(100%)	<10	1(100%)	<10
1		No identificada sp2	1(100%)	<10	1(100%)	<10	1(100%)	<10	
1		No identificada sp3	1(100%)	<10	1(100%)	<10	1(100%)	<10	
Pindal 2019	Pindal	1	<i>Scaptotrigona</i>	1(100%)	<10	1(100%)	<10	1(100%)	30
	Doce de Diciembre	1	<i>Scaptotrigona</i>	1(100%)	160	1(100%)	130	1(100%)	<10

*Nota:* Conteo (UFC/g); MNPC muy numeroso para contar; <10 no identificación de colonias en la dilución decimal de la miel

**Tabla 10**

*Cuantificación de los microorganismos en la miel recolectada en los cantones de Celica y Puyango 2019*

Cantón	Parroquia	N°	Géneros	Aerobios mesófilos		Hongos y levaduras		<i>Staphylococcus aureus</i>	
				Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo	Frecuencia	Conteo
Celica	Teniente Maximiliano Rodríguez	5	<i>Scaptotrigona</i>	1(20%)	<10	5(100%)	<10	4(80%)	<10
				3(60%)	120-950			1(20%)	260
				1(20%)	MNPC				
	1	<i>Melipona</i>	1(100%)	MNPC	1(100%)	<10	1(100%)	<10	
	San Juan de Pozul	1	<i>Scaptotrigona</i>	1(100%)	MNPC	1(100%)	<10	1(100%)	<10
		1	<i>Melipona</i>	1(100%)	920	1(100%)	<10	1(100%)	<10
Puyango	Arenal	6	<i>Scaptotrigona</i>	6 (100%)	<10	6(100%)	<10	4(67%)	<10
								2(33%)	50-80
				1	<i>Nannotrigona</i>	1(100%)	<10	1(100%)	<10
		1	<i>Paratrigona</i>	1(100%)	30	1(100%)	500	1(100%)	340

*Nota:* Conteo (UFC/g); MNPC muy numeroso para contar; <10 no identificación de colonias en la dilución decimal de la miel

### Identificación de bacilos esporulados en la miel de abejas sin aguijón

Se registró la presencia de bacilos esporulados Gram positivos en el 48% (n=15/31) de las muestras de miel de abejas sin aguijón, reportando su presencia para los géneros: *Scaptotrigona* (n=7), *Melipona* (n=2), *Nannotrigona* (n=2), *Frieseomelitta*, *Oxytrigona* y en las especies no identificadas 1 y 3. En la tabla 11 se presenta la identificación del bacilos esporulados Gram positivos en muestras de miel de Loja.

**Tabla 11**

*Identificación de bacilos esporulados Gram positivos*

Géneros	Muestras de miel	Bacilos Esporulados Gram Positivos	
		Positivo	Negativo
<i>Scaptotrigona</i>	19	7 (37%)	12 (63%)
<i>Melipona</i>	4	2 (50%)	2 (50%)
<i>Nannotrigona</i>	2	2 (100%)	
<i>Frieseomelitta</i>	1	1 (100%)	
<i>Oxytrigona</i>	1	1 (100%)	
<i>Paratrigona</i>	1		1 (100%)
No identificada sp1	1	1 (100%)	
No identificada sp2	1		1 (100%)
No identificada sp3	1	1 (100%)	

El género *Bacillus* spp se ha reportado en muestras de miel de *Apis mellifera* (Fernández et al., 2017) y en abejas sin aguijón (Ruiz Calderón, 2019) en aproximadamente en la tercera parte del muestro, mediante la técnica de cultivo de endósporas. Según Grabowski & Klein (2015), las fuentes primarias de contaminación donde se puede encontrar el género *Bacillus* son aire, polvo, plantas, polen e incluso en el tracto gastrointestinal de abejas adultas.

Gilliam et al. (1990), reportó la presencia de especies de *Bacillus* spp en 50% (n=4/8) muestras de miel de *Melipona fasciata*, las especies más comunes fueron

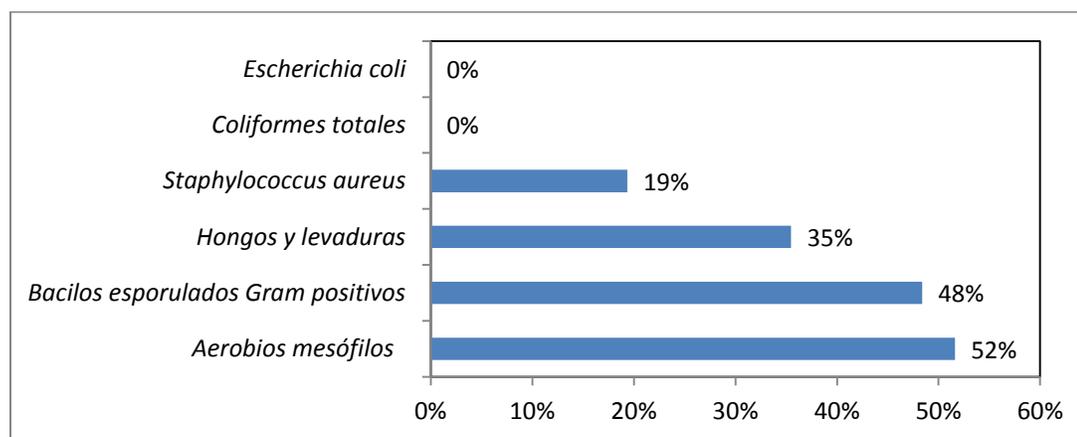
*Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans* y *Bacillus salve*. En estudios realizados por Yépez (2019) se identificó la presencia de 3 especies del grupo *Bacillus cereus* sensu lato (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus thuringiensis*) en 53% (n=20/38) muestras de miel de abejas *Apis mellifera* para 19 apiarios del cantón Mejía, provincia de Pichincha.

#### 4.2. Microorganismos en la miel

En el muestras de miel de abejas sin aguijón de la provincia de Loja se reportó la presencia de aerobios mesófilos en 52% (n=16/31), bacilos esporulados Gram positivos en 48% (n=15/31), hongos y levaduras en 35% (n=11/31), *Staphylococcus aureus* es 19% (n=6/31) y la ausencia de coliformes y *Escherichia coli* (Figura 6).

#### Figura 3

Porcentaje de microorganismos presentes en las muestras de miel



Se analizó la relación entre los resultados obtenidos de la identificación de hongos y levaduras, aerobios mesófilos, coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y bacilos esporulados Gram positivos en las muestras de miel de la provincia de Loja mediante la correlación de Spearman a un nivel de confianza del 5%. Los resultados de coliformes hacen referencia a la identificación de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en las muestras de miel.

Los resultados de la correlación de rho Spearman entre los diferentes microorganismos identificados para las 31 muestras de miel, con un nivel de probabilidad bilateral del 5% (tabla 12).

**Tabla 12**

*Correlación de los microorganismos presentes en la miel*

Microorganismos	Hongos y levaduras	Aerobios mesófilos	Coliformes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacilos esporulados Gram positivos
Hongos y levaduras	-	NS	NS	NS	NS	NS
Aerobios mesófilos	0.506	-	NS	NS	NS	NS
Coliformes	0.021	0.128	-	NS	NS	*
<i>Escherichia coli</i>	0.656	0.625	0.625	-	*	NS
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.409	0.284	0.381	0.762*	-	NS
Bacilos esporulados Gram positivos	0.250	0.178	0.953*	0.625	0.206	-

*Nota:* \* ( $p < 0.05$ ), NS: no significativo. En parte diagonal inferior se reportan los valores de rho calculados y la parte superior diagonal se muestran correlación que existe entre los diferentes microorganismos.

Mediante la prueba de Spearman se identificó una correlación alta entre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, esto indica una relación entre las muestras que no presentaron crecimiento de estos microorganismos. También se observó una correlación muy alta entre el crecimiento o ausencia de coliformes y bacilos esporulados Gram positivos, lo cual puede explicar la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa producida por *Bacillus* spp según resultados reportados para la miel de abejas sin aguijón por Gilliam et al (1990).

De la misma forma, se registró una correlación moderada o baja para los demás microorganismos identificados en la muestras de miel. La presencia de hongos y

levaduras en las miel no afectaron a sus propiedades físicoquímicas como un pH neutro, lo cual permite la proliferación de microorganismos patógenos (Andrews, 1992).

#### 4.2.1. Microorganismos según los períodos de recolección

Mediante la prueba de Chi cuadrado se comparó si existe relación entre la ausencia o presencia de mesófilos aerobios, hongos y levaduras, *Staphylococcus aureus* y bacilos esporulados Gram positivos con el período de recolección. Considerando un nivel de confianza del 5%, con un grado de libertad del uno. En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos.

**Tabla 13**

*Prueba de Chi cuadrado (microorganismos en la miel versus período de muestreo)*

<b>Muestreo</b>	<b>N°</b>	<b>Hongos y levaduras</b>	<b>Aerobios mesófilos</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>Bacilos esporulados Gram positivos</b>
General	31	12.62*	9.04	2.28	0.53

*Nota:* \*significativo; ( $p < 0.05$ ); un grado de libertad

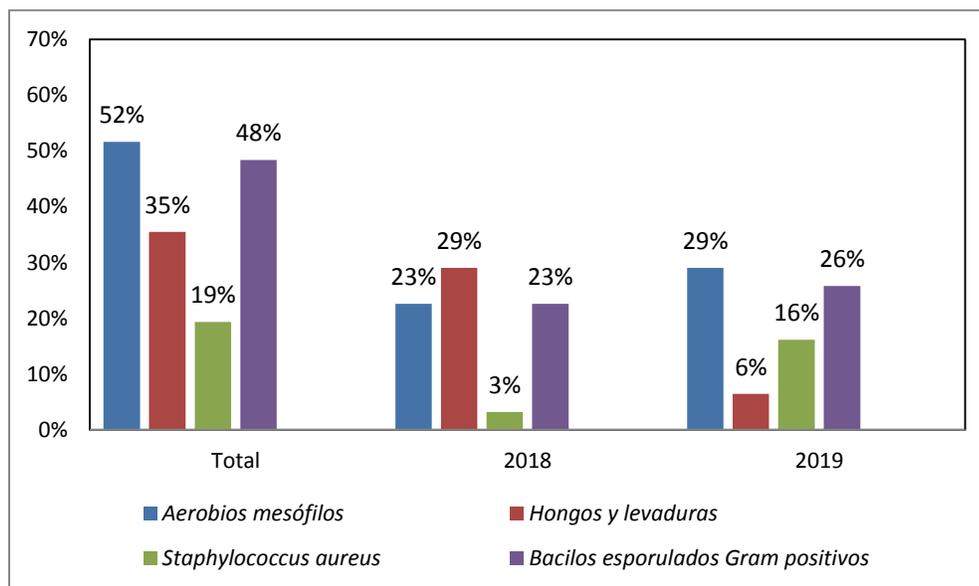
Mediante la prueba de Chi cuadrada se puede concluir que el período de muestreo se relaciona con la presencia o ausencia de hongos y levaduras, y aerobios mesófilos, pero no con la identificación de *Staphylococcus aureus* y bacilos esporulados Gram positivos en las muestras de miel de abejas sin aguijón recolectadas en la provincia de Loja.

En la figura 7 se puede apreciar que el porcentaje de hongos y levaduras es mayor en las mieles muestreadas durante el 2018, en comparación al período 2019. También se observa el incremento de muestras de miel que presentan *Staphylococcus aureus* durante el 2019. Según Mauriello et al. (2017), las condiciones de congelación pueden

afectar la carga microbiana de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en productos de panal como el polen.

**Figura 4**

*Microorganismos en miel según los períodos de recolección*



#### 4.2.2. Identificación de microorganismos según los cantones muestreados

Para identificar si el cantón muestreado se relaciona con la presencia o ausencia mesófilos aerobios, hongos y levaduras, *Staphylococcus aureus* y bacilos esporulados Gram positivos se consideró las muestras de miel del género *Scaptotrigona* para Pindal (n=7), Celica (n=6) y Puyango (n=6).

Los resultados de Chi cuadrado se presentan en la tabla 14, considerando dos grados de libertad a un nivel de confianza del 5%.

**Tabla 14**

*Prueba de Chi cuadrado (microorganismos en la miel versus cantón de muestreo)*

Muestras de miel	N°	Hongos y levaduras	Aerobios mesófilos	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacilos esporulados Gram positivos
Género <i>Scaptotrigona</i>	19	14.07*	2.03	0.13	0.83
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	13	8.78*	0.66	0.04	1.73

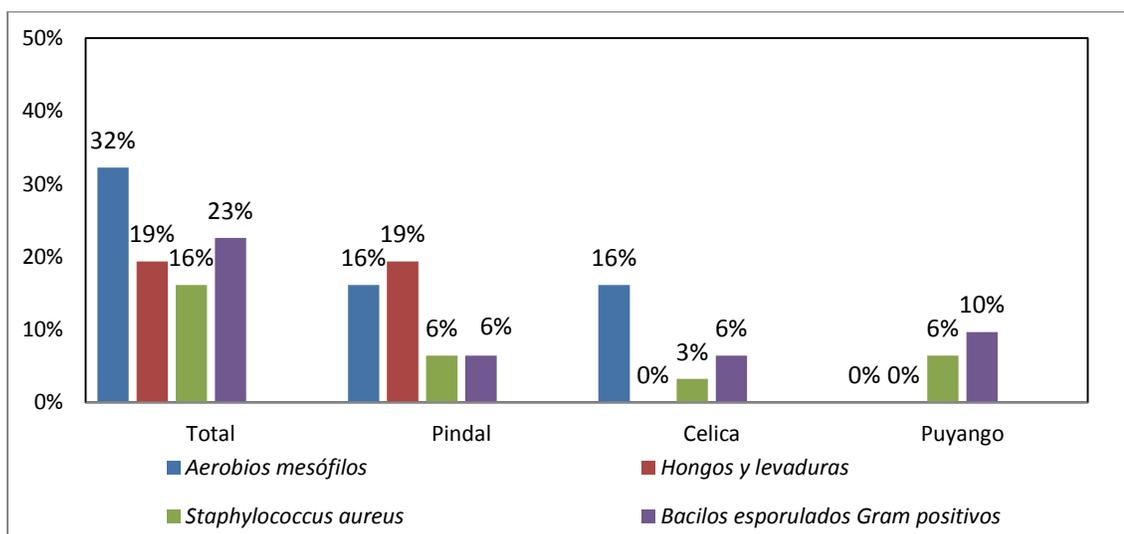
*Nota:* \* significativo; ( $p < 0.05$ ), dos grados de libertad

En conclusión, la detención de hongos y levaduras tanto en las mieles del género *Scaptotrigona* como para la especie *Scaptotrigona pectoralis* se relaciona con los cantones muestreados; pero la identificación de aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* y bacilos esporulados Gram positivos no se relaciona con la zona muestreada.

En la figura 9 se puede apreciar que la detección de hongos y levaduras solo se da en muestras de Pindal, mientras en muestras de Puyango no se detecta el crecimiento de aerobios mesófilos, y la detección de bacilos esporulados Gram positivos y *Staphylococcus aureus* se muestran en los tres cantones.

**Figura 5**

*Microorganismos en la miel de Scaptotrigona pectoralis según los cantones*



### **Criterios microbiológicos de la miel *Apis mellifera***

En las muestras de miel de abejas sin aguijón de la provincia de Loja se registró la presencia de aerobios mesófilos en 52% de las mieles ( n=16/31), pero las mieles del género *Scaptotrigona* (n=2) y *Melipona* (n=1) provenientes del cantón de Céllica presentaron numerosas colonias para contar ( $>1 \times 10^4$  UFC/g), es decir, estas muestras superaron el límite permitido para el conteo de aerobios mesófilos según la normativa peruana NTS 071 y costarricense RTCR 423 (MAG-MEIC, 2006; MINSA/DIGESA, 2008). Igualmente si se considera la resolución 1057-10 de Colombia, solo las muestras de miel del cantón Celica no cumplirían con los requisitos de calidad (Ministerio de la protección Social-Colombia, 2010).

Ruiz Calderón (2019) reportó un alto recuento de mesófilos aerobios para muestras de miel del género *Scaptotrigona* y *Melipona*, mediante el empleo de placas de conteo rápido de la marca Petrifilm 3M. Por técnicas convencionales de recuento, se ha registrado un recuento de mesófilos aerobios de 540 UFC/g para mieles de *Tetragonisca angustula* de origen colombiano (Aguillón Márquez et al., 2015) y un recuento superior a  $10^4$  UFC/g de aerobios mesófilos en muestras de mieles de abejas *Apis* (Fernández et al., 2017; Vázquez-Quiñones et al., 2017) y *Tetragonisca angustula* (Pucciarelli et al., 2014) (tabla 15).

La presencia de hongos y levaduras se registró en once muestras (36%), de las cuales cuatro presentaron un conteo superior a  $10^2$  UFC/g, pertenecientes al género *Paratrigona*, *Scaptotrigona* (n=2) y la especie no identificada 1 provenientes del cantón Pindal y Puyango. De acuerdo a la NTE INEN 1572 (2016), estas mieles no cumplen con los criterios microbiológicos.

Ruiz Calderón (2019) mediante el recuento por placas de conteo rápido de marca Petrifilm 3M no detectó un conteo superior a  $10^2$  UFC/g para las mieles del género *Scaptotrigona* (n=2), *Melipona* (n=3) y *Tetragonisca* (n=6) en la provincia de Orellana-

Ecuador. Por métodos convencionales para el recuento de hongos y levaduras, se ha registrado un conteo superior a  $10^2$  UFC/g para mieles del género *Tetragonisca angustula* (Aguillón Márquez et al., 2015; Pucciarelli et al., 2014) y mieles de abejas *Apis mellifera* (Fernández et al., 2017; Vázquez Quiñones et al, 2017) (tabla 15).

En las muestras de miel de la provincia de Loja no se detectó la presencia de coliformes ni *Escherichia coli*. Según la resolución del MERCOSUR (1995), las muestras cumplen con los criterios de calidad microbiológicos. Cabe mencionar que no se han reportado ensayos en miel con respecto a la identificación de coliformes mediante la detección de la enzima  $\beta$ -galactosidasa o el uso de un sustrato cromógeno.

Ruiz Calderón (2019) mediante el uso de placas de conteo rápido de la marca Petrifilm 3M CC basado en el método ISO 4832, identificó coliformes en el 40% (n=6/15) de las muestras de miel de abejas sin aguijón en la provincia de Orellana. Mediante el método del número más probable (NMP), se ha detectado coliformes en muestras de miel de *Tetragonisca angustula* de origen colombiano (Aguillón Márquez et al., 2015) y en mieles de *Apis mellifera* de origen argentino (Fernández et al., 2017) (tabla 15). Igualmente Souza et al. (2009) mediante la última técnica, no reportó la presencia de coliformes en mieles del género *Frieseomelita* (n=1), *Nannotrigona* (n=3), *Partamona* (n=1), *Scaptotrigona* (n=4) y *Tetragonisca* (n=5) recolectadas en el estado de Bahía-Brasil. La presencia de coliformes en miel se ha relacionado con el uso de indumentaria no apropiada durante el procesamiento de la miel (Ramos, 2019).

Ruiz Calderón (2019) mediante el uso de la placas de Petrifilm 3M, que tienen como principio la detección de la enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa identificó *Escherichia coli* en 26.6% (n=4/15) de muestras de abejas sin aguijón en Orellana-Ecuador. Mediante los métodos convencionales de identificación de *Escherichia coli*, no se ha identificado la presencia de *Escherichia coli* en muestras de miel de *Tetragonisca angustula* de origen

argentino (Pucciarelli et al., 2014) como colombiano (Aguillón Márquez et al., 2015), y tampoco en muestras de miel de *Apis mellifera* del origen argentino (Fernández et al., 2017) (tabla 15).

En la provincia de Loja se registró la presencia de *Staphylococcus aureus* en seis muestras de miel. Mediante la misma técnica Ruiz Calderón (2019) no registró la presencia de este microorganismo en mieles de abejas sin aguijón en la provincia de Orellana. Los métodos de detección de *Staphylococcus aureus* en la miel se basan en mismo principio de Petrifilm 3M, es decir, la reducción del telurito a telurio y la detección de lecitinasas; en mieles de *Tetragonisca angustula* de origen argentino (Pucciarelli et al., 2014) no se ha detectado la presencia de este microorganismo pero sí en mieles de *Apis mellifera* en Estambul (Dümen et al., 2013) y México (Vázquez-Quiñones et al., 2017)(tabla 15). En el tracto gastrointestinal de abejas adultas del género *Apis* se ha identificado a *Staphylococcus* spp (Grabowski & Klein, 2015). Sin embargo, Snowdon & Cliver (1996) mencionan que *Staphylococcus* spp no puede reproducirse ni generar toxinas en la miel.

No se realizaron los ensayos necesarios para la identificación de *Clostridium* spp en muestras de miel de la provincia de Loja debido al aislamiento por la pandemia del coronavirus. Mediante métodos de la ISO 15213:2003 basados en la identificación de colonias negras en medios selectivos enriquecidos con yema de huevo, que tienen como principio la reducción del ion sulfito a sulfuro en presencia de citrato férrico u otras sal de metales; varios autores reportan un conteo superior a 100 UFC/g en miel de *Tetragonisca angustula* (Aguillón Márquez et al., 2015; Pucciarelli et al., 2014) igualmente en mieles de *Apis mellifera* (Vázquez-Quiñones et al., 2017)(tabla 15).

El límite máximo para el recuento de *Clostridium* sulfito reductor no es constante en las normativas de los países latinoamericanos; por ejemplo, la normativa peruana NTS 071 (MINS/DIGESA, 2008) acepta hasta un conteo máximo de  $10^3$  UFC/g, mientras el

reglamento técnico centroamericano 67.04.50:08 (COMIECO, 2009) y la resolución 1057-10 de Colombia (Ministerio de la protección Social-Colombia, 2010) establecen un límite de  $10^2$  UFC/g, pero la Norma boliviana 38023 (INBORCA, 2006) no se aceptan la presencia de este microorganismo en la miel.

Según los criterios de calidad de la miel de *Apis mellifera* debe existir la ausencia de *Salmonella* por cada 25 g de miel (MERCOSUR, 1995). A pesar de no haber realizado las pruebas bioquímicas de identificación de *Salmonella* spp, mediante los resultados negativos de la detección de *Escherichia coli* se puede descartar la contaminación fecal en las mieles, por tanto la presencia de *Salmonella* spp (Ferrer Vera, 2005). Mediante los métodos de FDA-BAM basadas en el pre-enriquecimiento de las muestras de miel seguido de pruebas bioquímicas y serológicas, varios autores reportan la ausencia de esta bacteria en mieles de abejas *Apis mellifera* (Fernández et al., 2017; Vázquez-Quñones et al., 2017) y abejas sin aguijón (Aguillón Márquez et al., 2015; Pucciarelli et al., 2014)(tabla 15). Según Snowdon & Cliver (1996) las células bacterianas vegetativas de *Salmonella* spp pueden sobrevivir en la miel pero no pueden multiplicarse.

La miel de las abejas sin aguijón debido a su alto contenido de agua es más propensa a sufrir el proceso de fermentación, lo cual afecta a su sabor y textura. Es importante mencionar que la miel, a diferencia de los propóleos o polen, no recibe un tratamiento térmico o deshidratación para la reducción de gérmenes (Grabowski & Klein, 2015).

**Tabla 15**

*Estudios microbiológicos de la miel de Apis mellifera y abejas sin aguijón*

<b>Especies de abejas</b>	<b><i>Tetragonisca angustula</i></b>	<b><i>Tetragonisca angustula</i></b>	<b><i>Apis mellifera</i></b>	<b><i>Apis mellifera</i></b>	<b>Tribu <i>Meliponini</i></b>	<b>Estudio</b>	<b>Requisitos microbiológicos de la miel de abejas <i>Apis mellifera</i> según la tabla 2</b>
Lugar	Argentina *	Colombia **	Argentina ***	México ****	Orellana-Ecuador *****	Loja-Ecuador	
Número de muestras	28	6	163	1920	15	31	
Hongos y levaduras	NC	NC	1.8%	18%	ND	12.9%	10 <sup>2</sup> UFC/g
Aerobios mesófilos	10%	ND	14.7%	40.47%	26.6%	9.67%	10 <sup>4</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	-	26.6%	ND	Ausencia
Coliformes totales	-	NC	35%	ND	40%	ND	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	-	-	NC	ND	19%	Ausencia
<i>Clostridium sulfito reductor</i>	42.85%	50%	ND	12%	ND	-	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella</i> spp	ND	ND	ND	ND	ND	-	Ausente/25g

*Nota:* (-) ausencia de ensayo; UFC/g Unidades formadoras de colonias por gramo; NC número de muestras no contabilizadas; ND No detectado. Obtenido de: \*Pucciarelli et al. (2014), \*\*Aguillón Márquez et al. (2015), \*\*\* Fernández et al. (2017), \*\*\*\* Vázquez-Quiñones et al. (2017), \*\*\*\*\*Ruiz Calderón (2019)

## Revisión bibliográfica

### ***Actividad antimicrobiana de abejas sin aguijón***

Mediante la actividad antimicrobiana se puede justificar la ausencia de *Escherichia coli* y la baja frecuencia de *Staphylococcus aureus* en mieles de abejas sin aguijón recolectadas en la provincia de Loja.

Las investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón se centran en la identificación de compuestos fitoquímicos, los mismos que dependen de la región geográfica y de la diversidad botánica de la zona (Tuksitha et al., 2018). Guerrini et al. (2009) estudiaron la actividad antimicrobiana de mieles de abejas sin aguijón de la amazonia ecuatoriana, registrando una concentración mínima inhibitoria (CMI) menor contra bacterias Gram positivas en comparación a bacterias Gram negativas. Varios autores señalan que las bacterias Gram positivas suelen ser más susceptibles a la miel de abejas sin aguijón en comparación bacterias Gram negativas (Temaru et al., 2007; Zainol et al., 2013).

En el presente estudio, no se detectó la presencia de *Escherichia coli* ni *Staphylococcus aureus* en mieles producidas por el género *Melipona*. En estudios realizados por Ramón-Sierra et al. (2020) reportaron para mieles de *Melipona beecheinii* (Bennett, 1831) recolectadas en la comunidad de Maní en Yucatán-México, una CMI 16-20% (% p/v) contra cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Mercês et al. (2013) identificaron la actividad antimicrobiana de la miel de *Melipona asilvai* (Moure, 1971) recolectas en el estado de Bahía en Brasil, a una CMI del 70% y 35% (% v/v) contra cepas de *Escherichia coli* CCMB261 resistentes a sulfonamidas y *Staphylococcus aureus* CCMB262 resistente a estreptomicina y dihidroestreptomicina.

En estudios realizados por Pimental et al. (2013) mediante ensayos de macrodilución de caldo, identificaron que las mieles de *Melipona comprehensipes*

*manaosensis* (Schwarz, 1932) recolectadas durante la temporada seca y la temporada lluviosa en el estado Amazonas-Brasil, inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (O157:H7).

En el presente estudio no se identificó la presencia de *Escherichia coli* en muestras de miel del género *Scaptotrigona*, pero si se registró la presencia de *Staphylococcus aureus* en cinco muestras de *Scaptotrigona pectoralis* (Dalla Torre, 1896). En la investigación realizada por Dardón & Enríquez (2008), identificaron para la miel de *Scaptotrigona pectoralis* una CMI de 5% y 2.5% (% v/v) en contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras para la miel de *Scaptotrigona mexicana* (Guérin, 1844) reportaron una CMI de 5% (% v/v) contra ambas cepas.

Nishio et al. (2016), analizaron la actividad antimicrobiana de la miel de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier, 1836) y *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) recolectadas en en dos lugares específicos del estado de Paraná-Brasil, las cuales mostraron CMI de 5% y <1.25 %(% v/v) contra cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aures* ATCC 25923, respectivamente. Cardozo da Silva (2016), reportó la actividad antimicrobiana de *Scaptotrigona bipunctata* para diferentes departamentos de Paraná- Brasil, comprobando que la actividad antimicrobiana de las abejas sin aguijón no solo depende del tipo de abeja sino de factores intrínsecos y extrínsecos relacionados a la miel.

En el presente estudio, para mieles del género *Nannotrigona* no se registró el crecimiento de *Escherichia coli* ni *Staphylococcus aureus*. Dardón & Enríquez (2008) identificaron para la miel del especie *Nannotrigona perilampoides* (Cresson, 1878) de origen guatemalteco, una CMI de 5% (% v/v) contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 259922 .En ensayos realizados por Rodríguez- Malaver et al. (2009), reportaron para la miel *Nannotrigona melanocera* (Schwarz, 1938) de

origen peruano una CMI de 50% y 12.5% (%p/v) contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente.

En el presente estudio, en la muestra de miel del género *Frieseomelitta* no se identificó el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ni *Escherichia coli*. Mercês et al. (2013) reportaron la actividad antimicrobiana de *Frieseomelitta doederleinei* contra cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, registrando una CMI de 74 y 19% (% v/v), respectivamente. En estudios realizados por Brown et al. (2020) identificaron para las mieles de *Frieseomelitta nigra* (Cresson, 1878) de Trinidad y Tobago la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 22923 a una concentración del 8% (% p/v); también observaron una mejor actividad antimicrobiana para la miel de Tobago a CMI del 2% contra *Escherichia coli* 25922.

En mieles del género *Paratrigona* y *Oxytrigona* se reportó la ausencia de *Escherichia coli*; pero la miel del género *Paratrigona* registró un alto recuento de hongos y levaduras, y la presencia de *Staphylococcus aureus*. Para estos géneros no se han reportado estudios sobre la actividad antimicrobiana de la miel.

En la investigación de Kwakman et al. (2010) comprobaron que dependiendo del tipo de miel y el microorganismo a atacar, sus componentes antimicrobianos pueden actuar de forma sinérgica o incluso no tener efecto en la actividad antimicrobiana

## Capítulo VI-Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

- En las muestras de miel de abejas sin aguijón de la provincia de Loja se identificó aerobios mesófilos (52%, n=16/31), bacilos esporulados Gram positivos (48%, n=15/31), hongos y levaduras (35%, n=11/31), *Staphylococcus aureus* (19%, n=6/31) y la ausencia de coliformes totales y *Escherichia coli*.
- En el muestreo del Cantón Pindal (n=15) se identificó un recuento de hongos y levaduras superior a los 100 UFC/g, mientras en las muestras del cantón Celica (n=8) se detectó un recuento alto de aerobios mesófilos. Para las muestras del cantón Puyango (n=8) a excepción de una muestra, no se detectó el crecimiento de hongos y levaduras ni mesófilos aerobios.
- Mediante Chi cuadrado se comprobó que la presencia o ausencia de bacilos esporulados Gram positivos y *Staphylococcus aureus* en las muestras de miel de abejas sin aguijón no dependían de región muestreada ni del año recolección a un nivel de confianza del 5%.
- Se identificó que 38.7% (n=12/31) de las muestras de miel no cumplían con los requisitos establecidos para la miel de *Apis mellifera*. Para el género *Scaptotrigona* se obtuvo que nueve muestras no cumplen los requisitos de aerobios mesófilos (n=2), hongos y levaduras (n=2) y presentan *Staphylococcus aureus* (n=5). En muestras de miel de otros géneros como *Melipona*, *Paratrigona* y la especie no identificada 1 se registró un alto conteo de hongos y levaduras, y aerobios mesófilos e incluso la presencia de *Staphylococcus aureus*.
- Las muestras de miel del género *Scaptotrigona* que reportaron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, no representaron un crecimiento alto de hongos y levaduras o aerobios mesófilos. Considerando las investigaciones referentes a la actividad

antimicrobiana de la miel de este género, se podría decir que la presencia de este microorganismo se debe posiblemente a la contaminación secundaria.

- En la miel del género *Paratrigona* se reportó la presencia de *Staphylococcus aureus* y un recuento de 500 UFC/g de hongos y levaduras. Posiblemente la calidad de la miel se deterioró por la presencia de hongos y levaduras, permitiendo la proliferación de *Staphylococcus aureus*.

### **Recomendaciones**

- Realizar estudios comparativos entre los métodos convencionales y el uso de placas de conteo rápido para la detección de microorganismos en la miel.
- Desarrollar estudios referentes al recuento de microorganismos en la miel con la finalidad de establecer requisitos microbiológicos para *Apis mellifera* y para los distintos géneros de abejas sin aguijón en el Ecuador.
- Realizar análisis microbiológicos de la miel de las abejas sin aguijón para garantizar su inocuidad, y de este modo evitar el uso o consumo de productos con alta carga microbiológica.
- Se recomienda a los meliponicultores durante y después de la cosecha de la miel cumplir con los estándares de saneamientos necesarios para evitar la contaminación secundaria en la miel.

## Capítulo VII- Bibliografía

- Abd Jalil, M. A., Kasmuri, A. R., & Hadi, H. (2017). Stingless Bee Honey , the Natural Wound Healer: A Review. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30, 66–75. <https://doi.org/10.1159/000458416>
- Acha, P. N., & Szyfres, B. (2001). Colibacilosis, Salmonelosis. In *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales Tercera edición. Volumen I. Bacteriosis y Micosis* (pp. 75–85, 240–254). Organización Panamericana de la Salud.
- Aguillón Márquez, M. A., Hernández, C., & Correa, R. (2015). *Caracterización Microbiológica en miel de Apis mellifera y Tetragonisca angustula*.
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., & Ansari, M. J. (2012). Antibiotic , Pesticide , and Microbial Contaminants of Honey: Human Health Hazards. *The Cientific World Journal*, 1–9. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>
- Andrews, W. (1992). *Manuals of food quality control, Chapter 4 - Microbiological analysis*. FAO, Food and agriculture Organization of the United Nations.
- Anduaem, B. (2013). antibacterial activity of stingless bee ( A pis mellipodae ) honey and garlic ( A llium sativum ) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria C ombined. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 725–731. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60146-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60146-X)
- Arnold, N., Zepeda, R., Vásquez Dávila, M., & Aldosoro Maya, M. (2018). *Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca , México con catálogo de especies Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca , México con catálogo de especies*. ECOSUR-CONABIO.
- Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsin, B., & Torres, V. J. (2019). La patogénesis de Staphylococcus aureus en diversos entornos de huésped. *Pathogens and Disease*, 75(1), 1–13.

- Barrerio, J., & Sandoval, A. (2006). Acidez o pH. In *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas* (p. 50). Equinoccio. Universidad Simón Bolívar.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for Nutrition and Health : A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 667–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Boorn, K. L., Khor, Y., Sweetman, E., Tan, F., Heard, T. A., & Hammer, K. A. (2010). Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion , agar dilution , broth microdilution and time-kill methodology. *Applied Microbiology*, 108, 1534–1543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04552.x>
- Borba, R. S., Klyczek, K. K., Mogen, K. L., & Spivak, M. (2015). Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *The Company of Biologists*, 3689–3699. <https://doi.org/10.1242/jeb.127324>
- Boulanger, C., Archambault, M., & Prouix, V.-F. (2006). L'infectiologie en region isolée...des diagnostic plutôt exotiques. *Le Médicin Due Québec*, 41(10), 83–89.
- Brown, E., O'Brien, M., Georges, K., Suepaul, S. (2020). Physical characteristics and antimicrobial properties of *Apis mellifera*, *Frieseomelitta nigra* and *Melipona favosa* bee honeys from apiaries in Trinidad and Tobago. *BMC Complement Med Ther* 20(85), 1-9.
- Brudzynski, K., Abubaker, K., & Miotto, D. (2012). Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry*, 133(2), 329–336.
- Bueno-Costa, F. M., Zambiasi, R. C., Bohmer, B. W., Chaves, F. C., Padilha da Silva, W., Teixeira Zanusso, J., & Dutra, I. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.018>

- Casalone, E., Cavalieri, D., Daly, G., Vitali, F., & Perito, B. (2020). Propolis hosts a diverse microbial community. *World J Microbiol Biotechnol*, 36(50), 2020.
- Cardozo Da Silva, L.(2016). Actividad antimicrobiana de miel de meliponidos obtenidos de diferentes regiones de Paraná-Brasil. Universidad Tecnológica Federal de Paraná.
- COMIECO. (2009). Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. In *Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08* (p. 31).
- CONACYT. (2008). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Miel de abejas. Especificaciones. In *Norma Salvadoreña NSO 67.19.01:08* (p. 6).
- Correa, A. (2015). Ministerio de agricultura y ganaderia y Ministerio de energía, industria y comercio. Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas. In *Universidad Nacional de Colombia*. <http://www.icta.unal.edu.co/>
- Dardón, M. J., & Enríquez, E. (2008). Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón ( Meliponini ) de Guatemala. *Interciencia*, 33(12), 916–922.
- Dümen, E., Akkaya, H., Öz, G. M., & Sezgin, F. H. (2013). Microbiological and parasitological quality of honey produced in İstanbul. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37, 602–607. <https://doi.org/10.3906/vet-1301-46>
- Efem, S. E., Udoh, K. T., & Iwara, C. I. (1992). The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*, 20(4), 227–229.
- Erkan, M. E., Vural, A., Guran, H., & Durmusoglu, H. (2015). Microbiological investigation of honey collected from Şırnak province of Turkey. *The Hellenic Veterinary Medical Society*, 66(1), 22–26.
- Ewnetu, Y., Lemma, W., & Birhane, N. (2013). Antibacterial effects of Apis mellifera and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of Escherichia coli ,

- Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar , Northwest Ethiopia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(269), 1–7.
- Falchetti, A. M., & Nates-Parra, G. (2002). Las hijas del sol: Las abejas sin aguijón en el mundo Uwa, Sierra Nevada del Cocuy, Colombia. *Rostros Culturales de La Fauna*, 175–215.
- Fernández, L. A., Ghilardi, C., Hoffmann, B., Busso, C., & Gallez, L. M. (2017). Microbiological quality of honey from the Pampas Region (Argentina) throughout the extraction process. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.010>
- Ferrer Vera, P., & Morales Petersen, M. (2005). *Determinación de la calidad microbiológica de la miel*. Universidad Pública de Uruguay.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). Métodos que miden de forma directa la actividad antimicrobiana. In *Diagnóstico microbiológico* (pp. 188–198). Editorial Médica Panamericana.
- García del Valle, A., & Durán Zamudio, M. de las M. (1998). *Bacillus* spp. In *Manual de Microbiología Médica* (pp. 33–36). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guaita, M. (2019). Determinación de la presencia y caracterización molecular de *Nosema* sp. mediante PCR dúplex en abejas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) de las provincias de Orellana y Loja-Ecuador". Universidad de las Fuerzas Armadas Espe.
- Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L. & Sacchetti, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, 114, 1413-1420.
- Gilliam, M., Roubik, D. W., & Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions, in the nest of a stingless bee, *Melipona*

- fasciata. *Biochemistry*, 21, 89–97.
- Grabowski, N. T., & Klein, G. (2015). Microbiology and Food-borne Pathogens in Honey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0–38. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1029041>
- Grenda, T., Grabczak, M., Goldsztejn, M., Koziel, N., Kwiatek, K., Pohorecka, K., Skubida, M., & Bober, A. (2018). Clostridium Perfringens Spores in Polish Honey Samples. *Veterinary Research*, 62(3), 281–284.
- Hartfelder, K., Makert, G. R., Judice, C. C., Pereira, G. A., Santana, W. C., Dallacqua, R., & Bitondi, M. M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37(2), 144–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/apido:2006013>
- Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana-Metodología de Laboratorio. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 1–7.
- IMNC. (1981). Instituto Mexicano de normalización y certificación.Miel de abejas - especificaciones. In *NMX-F-036* (p. 5).
- INBORCA. (2006). Instituto boliviano de Normalización y calidad-NB-38023. Normativa Boliviana para la miel de abeja. In *NB 38023* (p. 8).
- Jaffé, R., Veiga, J. C., Pope, N. S., Lanes, É. C. M., Carvalho, C. S., Alves, R., Andrade, S. C. S., Arias, M. C., Bonatti, V., Carvalho, A. T., Castro, M. S. de, Contrera, F. A. L., Francoy, T. M., Freitas, B. M., Giannini, T. C., Hrncir, M., Martins, C. F., Oliveira, G., Saraiva, A. M., ... Imperatriz-Fonseca, V. L. (2019). Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. *Evol Appl*, 12(6), 1164–1177.
- Kacániová, M., Pavlicová, S., Hačpík, P., Kociubinski, G., Kmazovická, V., Sudzina, M., Sudzinová, J., & Fikselová, M. (2009). Microbial communities in bees, pollen and

- honey Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56(3), 285–295.  
<https://doi.org/10.1556/AMicr.56.2009.3.7>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Critical Review Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*, 64(1), 48–55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Kwakman, P. H. S., Velde, A. A. te, de Boer, L., Speijer, D., Vandaenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2010). How honey kills bacteria. *The FASEB*, 24, 2576–2582.
- López-Roldán, P. & Fachelli, S.(2015). Metodología de la investigación social cuantitativa. Barcelona. Universidad Autónoma de Barcelona (pag 20-28)
- MAG-MEIC. (2006). Reglamento técnico para miel de abejas. In *RTCR 423* (p. 7).  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3234941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Martínez, M. S. (2015). *Desarrollo sostenible y conservación etnoecológica a través de la meliponicultura, en el sur de Ecuador* [Universidad Internacional de Andalucía].  
[http://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/3519/0673\\_Martinez.pdf?sequence=1](http://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/3519/0673_Martinez.pdf?sequence=1)
- Mauriello, G., De Prisco, A., Di Prisco, G., La Stora, A., & Caprio, E. (2017). Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PLoS ONE*, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183208>
- Mayes, D. M., Bhatta, C. P., Shi, D., Brown, J. C., & Smith, D. (2019). Body Size Influences Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae) Communities Across a Range of Deforestation Levels in Rondônia, Brazil. *Insect Sci*, 19(2), 1–7.
- Menezes, C., Vollet-neto, A., Andrés, F., León, F., Venturieri, G. C., & Imperatriz-fonseca, V. L. (2013). The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In *Pot-Honey: A legacy of stingless bees* (pp. 153–171).  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7>
- Mercês, M. D., Peralta, E. D., Trovatti Uetanabaro, A. P., & Lucchese, A. A. (2013).

- Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. *Ciência Rural*, 43(4), 672–675.
- MERCOSUR. (1995). Reglamento Técnico MERCOSUR de identidad y Calidad de la Miel. In *Resolución N° 15/94* (pp. 1–10).
- Michener, C. (2007). Tribe Meliponini. In *The bees of the world* (pp. 803–830).
- Ministerio de la protección Social-Colombia. (2010). *Resolución 1057: Requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para consumo humano* (pp. 1–11).
- MINSA/DIGESA. (2008). Dirección General de Salud Ambiental-Ministerio de Salud de Perú. Miel, Jalea Real y similares. In *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. NTS 071* (p. 12).
- Mustafina, R., Maikanov, B., Wiśniewski, J., Tracz, M., Anusz, K., Grenda, T., Kukier, E., Goldsztejn, M., & Kwiatek, K. (2015). Contamination of honey produced in the Republic of Kazakhstan with *Clostridium botulinum*. *Bull Vet Inst Paulawy*, 59, 241–246. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0036>
- Ngalimat, M. S., Raja Abd Rahman, R. N. Z., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabril, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee , *Heterotrigona itama* , honey , bee bread and propolis. *PeerJ*, 1–20. <https://doi.org/10.7717/peerj.7478>
- Nishio, E. K., Ribeiro, J. M., Oliveira, A. G., Andrade, C. G. T. J., Proni, E. A., & Kobayashi, R. K. T. (2016). Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees : *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Scientific Reports*, 6(21641), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21641>
- Nolan, V. C., Harrison, J., & Cox, J. A. G. (2019). Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. *Antibiotics*, 8(251), 1–16.
- Nordin, A., Sainik, N., Chowdhury, S., Saim, A., & Idrus, R. (2018). Physicochemical

- properties of stingless bee honey from around the globe : A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 91–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>
- NTE. (2016). Norma técnica Ecuatoriana INEN 1572. Requisitos de la miel de abeja. In *NTE INEN 1572* (No. 1572; p. 4). <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>
- Pachacama, R. (2020). *Caracterización de la biogeografía de abejas nativas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini), mediante morfometría geométrica en la provincia de Loja – Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Palacios, E. (2020). *Determinación de la diversidad genética mediante caracterización molecular y análisis filogenético de abejas nativas sin aguijón (Hymenoptera: Meliponini) de las provincias de Orellana y Loja, Ecuador*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Petrifilm 3M. (2014). *Recuento de Staphylococcus aureus*.  
<https://multimedia.3m.com/mws/media/467012O/3m-petrifilm-staph-express-interpretation-guide-spanish.pdf>
- Pimentel, R. B., da Costa, C. A., Albuquerque, P. M., & Junior, S. D. (2013). Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(151), 1–14.
- Pucciarelli, A. B., Schapovaloff, M. E., Kummritz, S. K., Seňuk, I. A., Brumovsky, L. A., & Dallagnol, A. M. (2014). Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 325–332.  
[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70091-4](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70091-4)
- Ramírez, J., Ureña, J., & Camacho, A. (2012). Las abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) de la región sur del Ecuador. *Estudios Universitarios Universidad*

*Nacional de Loja, 2002010010, 104–111.*

- Ramírez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antimicrobiana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica, XV(42), 263–268.*
- Ramón-Sierra, J., Martínez-Guevara, J. L., Pool-Yam, L., Magaña-Ortiz, D., Yam-Puc, A., & Ortiz-Vázquez, E. (2020). Effects of phenolic and protein extracts from *Melipona beecheii* honey on pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Sci Biotechnol, 1–9.* <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00744-4>
- Ramos, Erika (2019). Determinación de coliformes totales en miel de abejas en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha, Ecuador. Universidad Central del Ecuador
- Ranneh, Y., Akim, A., Hamid, H. A., Khazaai, H., Fadel, A., & Mahmoud, A. M. (2019). Stingless bee honey protects against lipopolysaccharide induced-chronic subclinical systemic inflammation and oxidative stress by modulating Nrf2 , NF- κ B and p38 MAPK. *Nutrition & Metabolism, 16(15), 1–17.*
- Rao, P. V., Krishnan, K. T., Salleh, N., & Gan, S. H. (2016). Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees : a comparative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy, 26, 657–664.* <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>
- Rasmussen, C., & Cameron, S. A. (2010). Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long distance dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society, 99(1), 206–232.* <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01341.x>
- RENALOA. (2014). Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos. Microorganismos Indicadores. In *Análisis microbiológico de los alimentos.*

- Metodología analítico oficial. volumen 3* (p. 5,6,75,76,77,78,131,132,133). ANMAT.
- Rodríguez-Malaver, A. J., Rasmussen, C., Gutiérrez, M. G., Gil, F., Nieves, B., & Vit, P. (2009). Natural Product Communications Properties of Honey from Ten Species of Peruvian Stingless Bees. *Natural Product Communications*, 4(9), 1221–1226.
- Ruiz Calderón, P. L. (2019). *Caracterización Físicoquímica y microbiológica de miel de la Tribu Meliponini en la provincia de Orellana-Ecuador*.
- Salamanca Grosso, G., Henao Rojas, C. A., Moreno, G. I., & Luna, A. (2000). *Características microbiológicas de las mieles tropicales de Apis mellifera*. Universidad Tolima. [apacitateparaelemplo.org/pages.php?r=.tema&tagID=2281&load=2624&n=1&brandid=capacitate](http://apacitateparaelemplo.org/pages.php?r=.tema&tagID=2281&load=2624&n=1&brandid=capacitate)
- Schelegel, H. (1997). Cocos Gram positivos. In *Microbiología General* (pp. 98, 99). <https://doi.org/10.1029/GL003i001p00037>
- Sigma-Aldrich. (2020). *Pick the Right One at a Glance – Color-coded MC-Media Pads®*. How to Use MC-Media Pad®. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/microbiology/color-coded-mc-media-pads.html>
- Simone-Feinstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health : the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41, 295–311.
- Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1–26.
- Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., Villas-Bôas, J., Marchini, L., Locatelli, J., Persano-Oddo, L., Almeida-Muradian, L., Bogdanov, S., & Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciencia*, 31(12), 867–875.
- Souza, B., Marchini, L., Dias, C., Oda-Souza, M., Carvalho, C., Alves, R. (2009). Microbiological evaluation of trigonine bee (Apidae:Trigonini) honey samples from

- the State of Bahia-Brazil. *CiêncTecnol Aliment Campinas*.29:798-802.
- Temaru, E., Shimura, S., Amano, K., & Karasawa, T. (2007). Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). *Polish Journal of Microbiology*, 56(4), 281–285.
- Tuksitha, L., Chen, Y. S., Chen, Y., Wong, K., & Peng, C. (2018). Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo ( Sarawak ). *Asia-Pacific Entomology*, 21, 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.03.007>
- Vázquez-Quiñones, C. R., Moreno-Terrazas, R., Natividad-bonifacio, I., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2017). Microbiological assessment of honey in México. *Revista Argentina de Microbiología*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>
- Vit, P., Gonzalez, I., Sorroza, L., & Pedro, S. R. M. (2016). Caracterización físicoquímica de miel de angelita *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) producida en Esmeraldas, Ecuador. *Ciencia Unemi*, 9(20), 77–84. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp77-84p>
- Yépez, B. (2019). Determinación de la presencia o no de *Bacillus cereus* sensu lato en miel de abejas de apiarios del cantón Mejía de la provincia de Pinchincha. Universidad Central del Ecuador.
- Zainol, M. I., Mohd Yusoff, K., & Mohd Yusof, M. Y. (2013). Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(129), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-129>
- Zulhairi Amin, F. A., Sabri, S., Malihan Mohammad, S., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Norhaizan, M. E., & Zawawi, N. (2018). Therapeutic Properties of Stingless Bee Honey in Comparison with European Bee Honey Honey and European Bee Honey. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1–12.

## Capítulo VIII- Anexos