

Artículo original

Bacteriología de la miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú

[Bacteriology of honey from stingless bees in Loreto, Peru]

Stefany Paola Vela-Santana^{*1}, Álvaro Tresierra-Ayala², César Delgado Vásquez³

1. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Facultad de Ciencias Biológicas (FCB).
Campus Universitario Zungarococha, San Juan Bautista, Loreto, Perú.

Correo electrónico: svelasantana@gmail.com (S. P. Vela-Santana * Autor para correspondencia).

2. Universidad Científica del Perú (UCP). Av. A. Quiñones km 2,5 (Iquitos), San Juan Bautista,
Maynas, Loreto, Perú. Correo electrónico: atresierraayala@hotmail.com (A. Tresierra-Ayala).

3. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Dirección de Investigación en Diversidad
Biológica Terrestre Amazónica (DBIO). Av. A. Quiñones km 2,5, San Juan Bautista, Maynas, Loreto, Perú.
Correo electrónico: cdelgado@iiap.gob.pe (C. Delgado).

Resumen

La manipulación inadecuada de la miel puede atribuirle características bacteriológicas perjudiciales para nuestra salud que se agudizan con la presencia de *Escherichia coli*. Por lo cual, el objetivo fue evaluar las características bacteriológicas de la miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú. En cuanto a las unidades formadoras de colonias, la miel madura fue la muestra que menos colonias presentó, con 800 UFC. Se empleó cepas de *E. coli* drogorresistente frente a cuatro muestras de miel madura, inmadura, colectada por el productor y envasada por el productor. *E. coli* logra sobrevivir hasta 32 h en las muestras de miel, mostrando una mayor capacidad antibacteriana en la miel envasada por el productor de 11,74 mm de halo inhibitorio, respecto a la concentración inhibitoria mínima y bactericida mínima, se obtuvo a 125 mg/ml siendo similares en muestras de miel madura, colectada por el productor y envasada por el productor, por lo que se necesita cuatro veces más de miel inmadura para lograr un efecto similar. La miel de meliponidos en nuestro estudio muestra efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* drogorresistente, por lo que su potencial uso medicinal es muy prometedor.

Palabras clave: Bacteria, Efecto inhibitorio, *Escherichia coli*, Uso medicinal.

Abstract

Improper handling of honey can attribute to it bacteriological characteristics that are harmful to our health, which are exacerbated by the presence of *Escherichia coli*. Therefore, the objective was to evaluate the bacteriological characteristics of honey from stingless bees in Loreto, Peru. Regarding the colony-forming units, the mature honey was the sample that presented the fewest colonies, with 800 CFU. Strains of drug-resistant *E. coli* were used against four samples of mature, immature honey collected by the producer and packaged by the producer. *E. coli* manages to survive up to 32 h in the honey samples, showing a greater antibacterial capacity in the honey packaged by the producer of 11,74 mm of inhibitory halo, with respect to the minimum inhibitory and minimum bactericidal concentration, it was obtained at 125 mg /ml being similar in samples of mature honey, collected by the producer and packaged by the producer, so four times more immature honey is needed to achieve a similar effect. Meliponid honey in our study shows an inhibitory effect on the growth of drug-resistant *E. coli*, so its potential medicinal use is very promising.

Keywords: Bacterium, *Escherichia coli*, Inhibitory effect, Medicinal use.

INTRODUCCIÓN

La miel como todo producto de origen animal, tiene una microbiota original propia, constituida por diversas especies de microorganismos, con características específicas (Pérez, 1984; Souza *et al.*, 2006), sin embargo, la manipulación a la que es sujeta el producto puede atribuirle características bacteriológicas diferentes al producto original, como la determinación de la contaminación bacteriana de la miel en el proceso de extracción y envasado, tiempo de supervivencia de *Escherichia coli*, así como la determinación de la capacidad antibacteriana que posee la miel de abeja (Radwan *et al.*, 1984), estas características se agudizan con la presencia de gérmenes patógenos como *E. coli*, la que indicaría la existencia de una contaminación fecal debido a la falta de higiene en la extracción de la miel (Pérez, 1984).

Las aplicaciones de resultados se inician a partir de los datos de composición de 152 abejas sin aguijón (Meliponini) en muestras de miel, compilados de estudios desde 1964, y se evaluaron para proponer una norma de calidad para este producto dado que la miel de abejas sin aguijón tiene una composición diferente al de *Apis mellifera* (Souza *et al.*, 2006); debido al escaso conocimiento sobre el producto, la miel de abejas sin aguijón no está incluida en las normas internacionales para el análisis de la miel (Codex, 2001) y no está controlada por las autoridades de supervisión de los alimentos, por consiguiente, no existe ninguna garantía para los consumidores de este producto (Souza *et al.*, 2006). Los estándares internacionales de calidad, proponen evaluar la calidad de la miel considerando importante la evaluación de su calidad microbiológica (Mazariegos, 2006), de otro lado, se consideró a *E. coli* como un buen indicador de la factibilidad de albergar cepas enterotoxigénicas, enteroinvasivas, enteropatógenas o enterohemorrágicas (Codex, 2001).

Actualmente, la miel de meliponas es empleada en tratamientos antiinflamatorios, cicatrizantes y antimicrobianos, para ello se consideró que

su carga bacteriológica no represente un riesgo sobre heridas, úlceras y abrasiones, por consiguiente, la miel de abeja sin aguijón muestra una buena calidad microbiológica y un adecuado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varios microorganismos, por lo que su potencial uso terapéutico es prometedor (Pérez, 1984), ante ello la investigación realizada *in vitro* han sugerido la efectividad de la miel, frente a bacterias patógenas como *E. coli* (Cooper *et al.*, 2002); esta actividad antibacteriana se atribuyó a compuestos específicos presentes en la miel, cuya naturaleza y mecanismo de acción vienen siendo investigados (Fangio *et al.*, 2007).

Sobre la base de este hallazgo, se estudia la sensibilidad de *E. coli* frente a mieles producidas por abejas meliponas mediante técnicas de evaluación de actividad antibacteriana (Fangio *et al.*, 2007) como objetivo de estudio, para ello se emplea *E. coli* drogorresistente, la cual representa una problemática de la salud pública, por lo cual, muchos investigadores orientan sus actividades tras la búsqueda de alternativas para reemplazar a los antibióticos y lograr combatir estos agentes biológicos (Zamora y Arias, 2011).

Mediante este estudio se aporta al conocimiento científico algunas características bacteriológicas de miel producida por la comunidad de abejas sin aguijón, haciendo su notable efecto antimicrobiano pese a la composición de su carga bacteriana, encontrándose pocos estudios específicos al respecto en la Amazonía peruana. Este estudio tiene como objetivos: determinar la contaminación bacteriana de la miel en el proceso de extracción y envasado, estimar el tiempo de supervivencia de *E. coli* drogorresistente en miel de abeja, determinar la capacidad antibacteriana de la miel frente a *E. coli* drogorresistente, determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima de la miel sobre *E. coli* drogorresistente.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de estudio

La colecta del material biológico se llevó a cabo en 4 comunidades en el departamento de Loreto (Perú). Dos comunidades están ubicadas en la cuenca del río Nanay y otras dos en la cuenca del río Ucayali. Las que están ubicadas en la cuenca del río Nanay, en zonas de tierra firme, son Santa Rita 3° 43' 48" S, 73° 19' 25" O) y San Pedro (-3° 45' 10,32" S, 73° 20' 11,28" O), ubicados en la provincia Maynas, Loreto. En la cuenca del río Ucayali, se ubican las dos comunidades restantes Bagazán y Chingana, pertenecientes al distrito Sapuena, provincia Requena, Loreto, que corresponde al área de Amortiguamiento de la Reserva Nacional Pacaya Samiria y del Área de Conservación Regional Tamshiyacu-Tahuayo, respectivamente. La comunidad de Bagazán 4° 43' 31,94" S, 73° 32' 01,83" O) está ubicada en zonas de tierra firme; en tanto que la comunidad de Chingana (4° 42' 57,23" S, 73° 32' 20,06" O) se encuentra ubicada en zona inundable (Figura 1).

Procedimiento de muestreo de mieles

Se consideraron la colecta de cuatro muestras de miel por colmena: miel madura (seleccionado de porongos operculados dentro de la colmena, tiene coloración, consistencia y olores característicos), miel inmadura (producto acuoso en proceso de maduración), miel colectada por el productor y miel envasado por el productor. Las dos primeras muestras se colectaron con una jeringa estéril previa desinfección del opérculo de porongos. La muestra de miel colectada por el productor, se realiza de forma artesanal por los meliponicultores. Posteriormente el productor empleó un recipiente donde precedieron a envasar la miel. Se obtuvo 160 ml de cada muestra de miel, con un total de 640 ml de miel a partir de una colmena. En total se colectaron 19,2 Lt de miel de 30 colmenas para el estudio (Figura 2), ver Tabla 5, donde se muestra número de colmenas por comunidad y especies correspondientes.

Identificación de especies de abejas sin aguijón y empleo de cepas de *Escherichia coli*

La identificación de las especies de abejas, se realizó utilizando claves taxonómicas para meliponídeos de Michener (1990) y Roubick (1992), y descripciones de meliponas de Moure (1951). También se comparó con la colección de abejas nativas del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), las que fueron determinadas por Claus Rasmussen, especialista en abejas nativas de la Universidad de Dinamarca, quien determinó dos especies de abejas nativas que produjeron las mieles para el estudio, siendo *Melipona eburnea* y *Melipona grandis*. Este género de melipona se caracteriza por presentar estigma alar angosto, su borde dentro de la celda marginal es recto o cóncavo, las alas pueden extenderse escasamente al metasoma, presenta torax con pelos abundantes en algunas áreas tan largas como la tégula; la diferencia entre especies se debe a que *M. eburnea* mide de 13-14 mm, de color marrón y el número de hámuli que presenta es de 13; *M. grandis*, mide 15 mm, de color negrusco y el número de hamuli es de 15.

Se utilizó cepas de *Escherichia coli* drogorresistentes proporcionadas por el laboratorio de microbiología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), la identificación de las cepas bacterianas fue realizado mediante técnicas y procedimientos estandarizados, se realizó la caracterización microscópica (tinción gram) y pruebas bioquímicas de: oxidasa (-), utilización de azúcares (+), Indol (+), citrato (-) ácidos-RM (+) de acuerdo a INS (2011).

Técnica de estudio, procesamientos y análisis de datos

Para la técnica de recuento de colonias bacterianas se siguió la norma sanitaria que establece el MINSA (2008) en cumplimiento de la norma ISO 4833:2003 se realizó 4 diluciones decima-

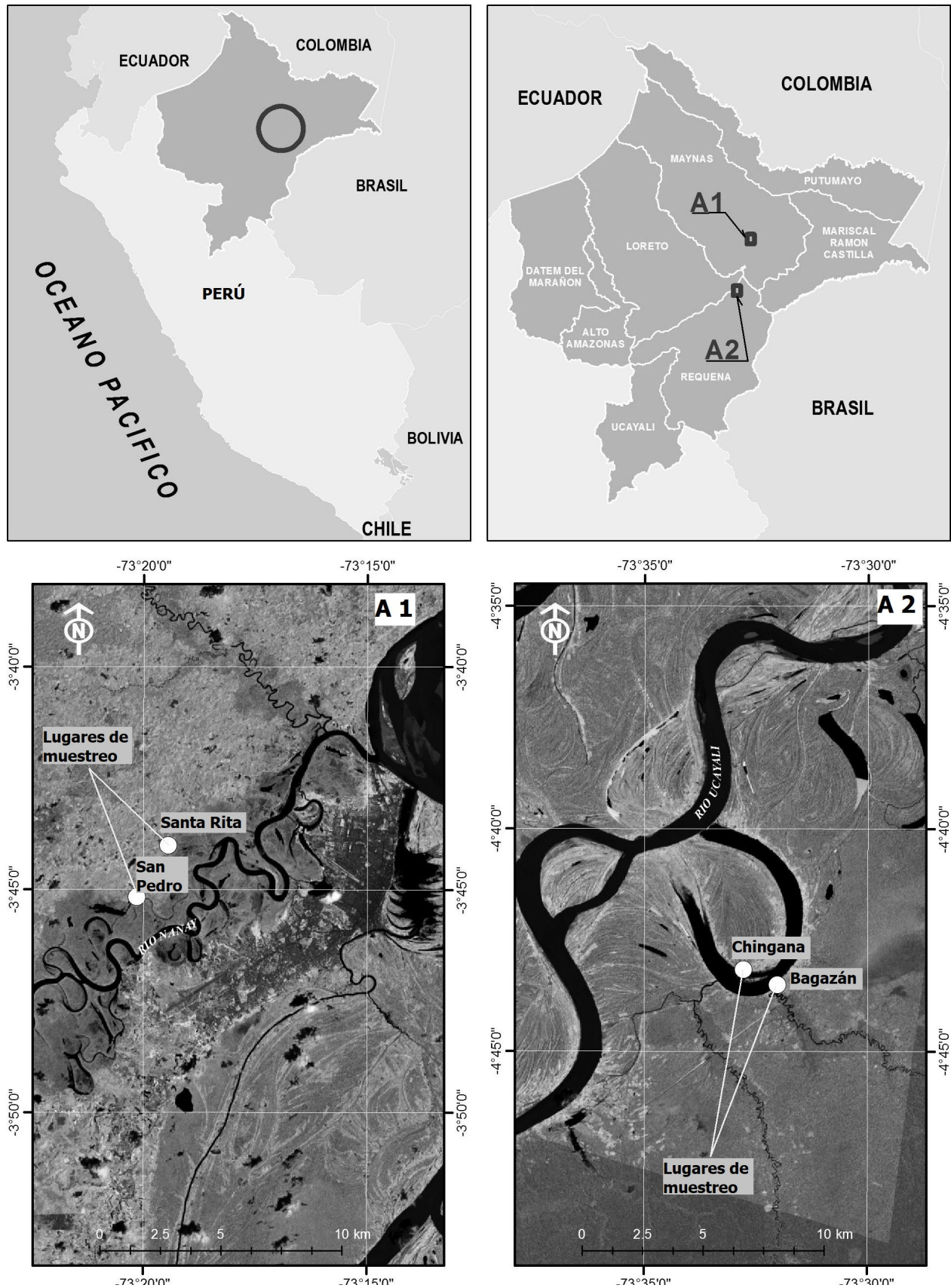


Figura 1. Ubicación de lugares de muestreo. A1. Cuenca del río Nanay: Santa Rita y San Pedro. A2. Cuenca del río Ucayali: Chingana y Bagazán, Loreto, Perú.

les, que consistió en transferir 10 ml de miel de abeja por muestra empleada, en 90 ml de Agua Peptonada Alcalina (APA), se repitió el procedimiento para cuatro diluciones decimales como fue necesario, tomando 1 ml de la dilución anterior para 9 ml de APA, se inoculó asépticamente 1 ml de cada dilución en dos placa petri, estéril posterior a ello se licuó el agar Plate Count dejando en baño María a una temperatura de 46 °C, de este contenido se añadió 20 ml del agar templado a cada placa de Petri siendo un total de ocho placas empleadas ya que se hizo cuatro diluciones por muestra, después de la mezcla y solidificación se invirtieron las placas para su posterior incubación; para el recuento de colonias, se contó todas las placas que contienen entre 30 a 300 colonias. Se empleó la prueba estadística de T-student, para buscar alguna diferencia entre las mieles producidas por las especies de meliponas identificadas en el estudio.

Para el tiempo de supervivencia, se siguieron las recomendaciones de Castañeda *et al.* (2014), preparando un contenido de 5 ml de miel de abeja, inoculada con suspensiones bacterianas de *E. coli* equivalente al tubo n° 1 del nefelómetro de Mac Farland donde se sembraron en agar soya tripticasa cada ocho horas para evaluar su crecimiento. En este análisis se agrupó las cuatro muestras independientemente a las especies que pertenecen, debido a que no se encontró diferencias significativas entre ellas, de acuerdo al primer análisis efectuado.

Para la determinación de la capacidad antibacteriana se siguió a Zamora *et al.* (2011) evaluando la presencia o ausencia de halos de inhibición de la miel, empleando cepas de *E. coli* diseminado en agar Mueller-Hinton seguido de realizar pocillos que contienen 0,5 ml de miel de abeja. Para demostrar específicamente la capacidad antibacteriana entre especies, se consideró las diferencias sutiles presentadas en la prueba estadística del primer análisis bacteriológico realizado, aplicando así el análisis de componentes principales con matriz de covarianza mostrando la acción bactericida de la miel de abeja donde la longitud de las flechas verdes indica la variable más importante.

En la aplicación de la técnica de determinación de la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima fue validada por Malbrán (2012), esta técnica fue aplicado debido a la presencia de halos de inhibición de la miel, donde se empleó el método de macrodilución en caldo, obteniendo un inóculo final aproximado de $7,5 \times 10^5$ UFC (unidades formadoras de colonias) /ml y las concentraciones finales de la miel fueron desde 125 mg/ml hasta 0,24 mg/ml. Los tubos fueron incubados y luego se procedió a calcular la concentración inhibitoria mínima, considerándola como el valor correspondiente al tubo con menor concentración de miel donde no hubo desarrollo bacteriano. Para la concentración bactericida mínima, se realizó a partir de cada tubo sin desarrollo bacteriano, sembrándolo por superficie en agar tripticasa de soya después de su incubación, se determinó la concentración bactericida mínima por el número de colonias en placas al subcultivo que produjo menos de 75 colonias. Para estos análisis realizados, se agruparon las cuatro muestras de mieles independientemente de su lugar de procedencia debido a que la estadística no mostró diferencia significativa entre ellas.

En estos tres últimos análisis se emplearon 5 cepas de *E. coli* bajo su condición drogoresistente haciendo así las veces de repeticiones para cada análisis bacteriológico respectivamente de las 30 colmenas.

Análisis de datos

Para determinar la contaminación bacteriana de la miel se empleó estadística descriptiva para muestras con distribución no normal, por ello se utilizó medianas, rango intercuartílico, rango al 90 %, y valores máximos y mínimos. Mientras que la comparación de la cantidad de bacterias por tipo y volumen de miel fue realizada con ANOVA de una vía previa transformación logarítmica con base 10. Respecto al tiempo de supervivencia de *E. coli*, en este análisis de datos de tipo categórico se realizó mediante la prueba G-test, el cual toma en consideración muestras pequeñas y grandes, resultando más sensible que la prueba Chi cuadrado. La prueba G comparó las proporciones de las frecuencias que la

bacteria sobrevivió a diferentes horas. Para la capacidad antibacteriana de la miel frente a *E. coli*, se utilizó estadística descriptiva para muestras con distribución normal. Se comparó la capacidad antibacteriana mediante ANOVA de una vía. Para encontrar el tipo de miel que puede explicar la mayor variabilidad en la muestra, se realizó el análisis de componentes principales con matriz de covarianza. En cuanto a la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de la miel sobre *E. coli*, se realizó con estadística descriptiva, y las comparaciones entre tipo de miel fue realizado con la prueba de Kruskal Wallis, por tratarse de datos continuos sin distribución normal.

Los programas estadísticos empleados fueron: Sigmaplot 11.0, BioEstat 5.0, Cap 4 setup (Análisis Package 4.0).

RESULTADOS

Contaminación bacteriana de la miel

En el proceso de extracción y envasado, la presencia de bacterias fue variable. La miel madura tuvo menos presencia de bacterias aerobias mesófilas viables, entre 22,5 y 67 900 unidades formadoras de colonias (UFC), de 27 colmenas (90 % de la muestra) con un valor medio de 800 UFC; es muy importante remarcar que hubo una muestra que no tuvo bacterias aerobias mesófilas viables, pero también hubo una muestra que llegó a tener 76 000 UFC. Mientras que la miel inmadura tuvo entre 815 y 4 295 000 UFC (90 %) y un valor medio de 46 000; aquí no hubo alguna muestra sin bacterias, el valor más bajo que se encontró en una muestra fue 800 UFC, pero también hubo valores que llegaron a 4 400 000. En la miel colectada por el productor hubo entre 150 y 12 895 000 UFC con un valor medio de 38 000; también todas las muestras tuvieron bacterias, el número más bajo registrado fue de 100 UFC, pero también se registró valores altos hasta 17 000 000. En la miel envasada se encontró entre 405 y 3 080 000 UFC con un valor medio de 10 000; la cantidad más baja registrada en esta etapa fue de 300 pero la máxima fue de 3 200 000 (Tabla 1).

El análisis comparativo de contaminación entre la miel producida por *M. eburnea* y *M. grandis* no fueron estadísticamente diferentes (Figura 3).

Tiempo de supervivencia de *Escherichia coli* drogoresistente

En muestras de miel madura se observó que la bacteria tuvo un tiempo máximo de supervivencia de 32 h y mínimo de 16 h, pero hubo mayor proporción de supervivencia hasta las 16 h. Este patrón fue similar en miel inmadura, miel colectada por el productor y miel envasada por el productor. Aparentemente la miel inmadura tuvo diferente patrón, pero este no fue significativo, indicando que sigue el mismo patrón de la miel madura (G-test=0,834; p=0,658). Es decir, el tiempo medio de supervivencia de las bacterias, 16 h, fue similar en todas las muestras de diferente proceso; *E. coli* no sobrevive más de 32 h, y esta supervivencia tiene un comportamiento gradual, el 50 % sobrevive hasta las 16 h, el 30 % hasta las 24 h y el 20 % restante hasta las 32 h (Tabla 2).

Capacidad antibacteriana de la miel frente a *Escherichia coli* drogoresistente

La miel de abeja envasado por el productor mostró mayor acción antibacteriana (11,74 mm de halo) que las demás muestras de miel, aunque esta capacidad fue similar al de la miel madura (10,31 mm), ver Tabla 3. La miel inmadura y la colectada por el productor presentaron halos de, 8,95 mm y 9,41 mm respectivamente, son las que tuvieron menor acción bactericida.

Las diferencias observadas de la acción antibacteriana pueden ser explicada en 2 componentes principales al 91,88 %. En el primer componente principal, hubo mucha diferencia que puede ser explicada al 68,29 % por la acción antibacteriana de la miel envasada por el productor, donde se muestra mayor acción antibacteriana de *Melipona eburnea* proveniente de la cuenca del Nanay (13,20 – 16,20 mm), aquellas que fueron de la cuenca del Ucayali tuvieron acción antibacteriana más baja (9,96-13,30 mm). En el caso de *M. grandis*, todas las muestras co-

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias de bacterias mesófitas viables en muestras de miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019. * Número de placas petris analizadas, **Rango sin valores atípicos o extremos, *** VI. 4 miel, jalea real y similares de la norma sanitaria MINSA (2008).

Muestras colectadas	N° (*)	Mediana	5-95% (**)	Mínimo	Máximo	(***)Limite/ g-Digesa 2008		Permi- sible
						Mínimo	Máximo	
Madura	240	800	22,5 – 67 900	0	76 000	10 ³	10 ⁴	SI
Inmadura	240	46 000	815 – 4 295 000	800	4 400 000	10 ³	10 ⁴	NO
Colectada por el productor	240	38 000	150 -12 895 000	100	17 000 000	10 ³	10 ⁴	NO
Envasada por el productor	240	10 000	405 – 3 080 000	300	3 200 000	10 ³	10 ⁴	SI

Tabla 2. Tiempo de supervivencia de *Escherichia coli* en procesos de extracción y envasado de miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019.













Horas de evaluación	Madura aséptica	Inmadura aséptica	Colectada por el productor	Envasada por el productor	% esperado
Inicio 0					
8					
16					50
24					30
32					20
40					
48					
56					
64					
Final 72					
G-Test/P	0,834/0,568	4,207/0,122	4,195/0,122	3,206/0,201	

Tabla 3. Valores de capacidad antibacteriana, medidas por halos de inhibición (mm) de miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019.

Miel de abeja	N	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Madura aséptica	17	10,31	1,74	7,2	12,93
Inmadura aséptica	10	8,95	1,42	7,3	11,82
Colectada por el productor	14	9,41	1,86	5,7	12,3
Envasada por el productor	9	11,74	2,60	8,3	16,2

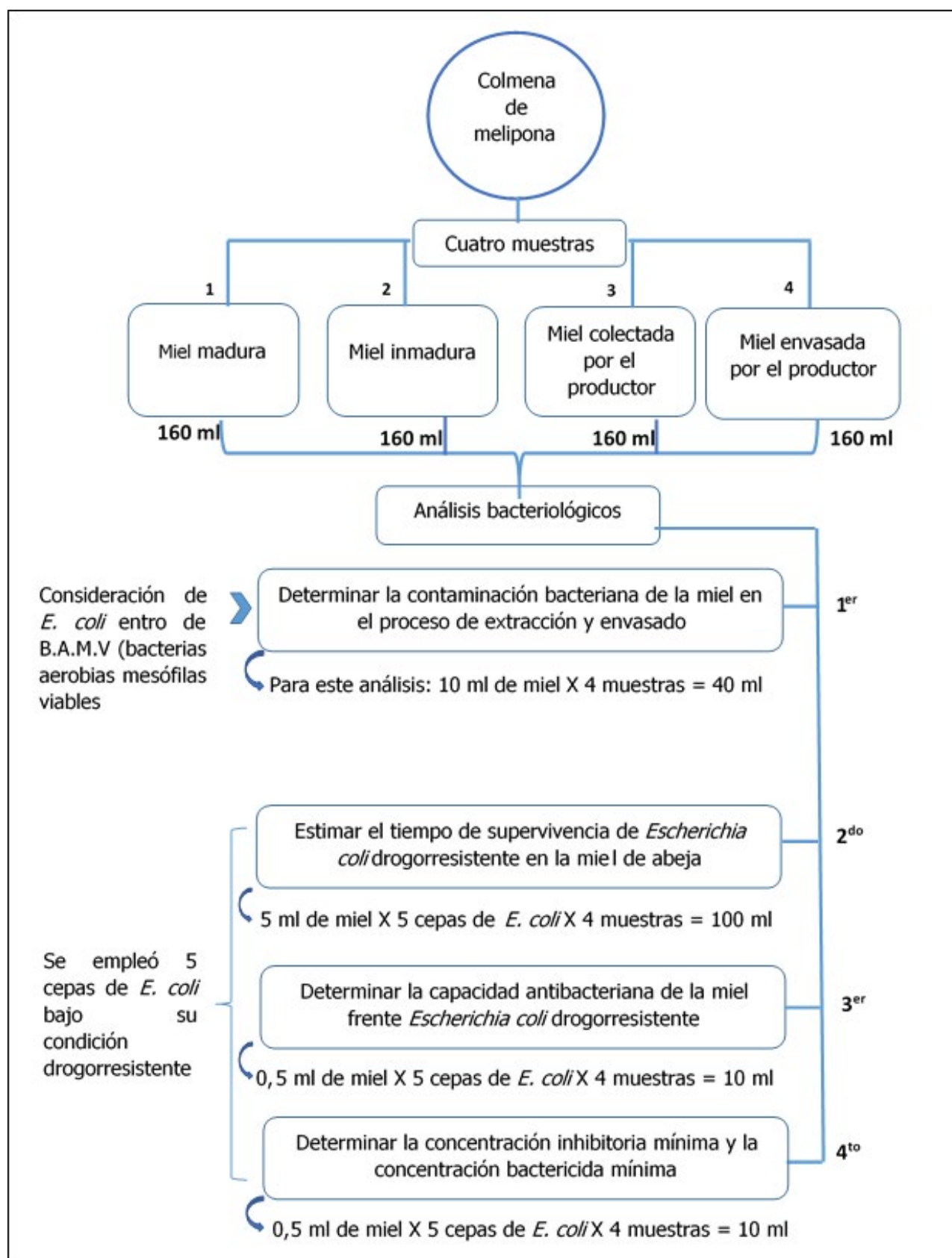


Figura 2. Procedimiento de análisis bacteriológicos de las muestras de miel de abeja a partir de una colmena de melipona en Loreto, Perú, 2019.

lectadas en el Nanay tuvieron menor valor en la acción bactericida (8,30-9,70 mm), pero tuvo una sola muestra con acción bactericida muy alta (14,30 mm) ver Tabla 4. La diferencia en el componente principal 2 sólo puede explicar el 23,59 %, en donde la miel envasada por el productor y miel madura fueron las más importantes, en el análisis de componentes principales se muestra la acción bactericida de la miel abeja (Figura 4).

Concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima

La concentración inhibitoria mínima fue similar tanto en la miel madura, colectada por el productor y envasado por el productor, las tres muestras de miel se inhibieron a 125 mg/ml. La miel inmadura excepcionalmente llegó a inhibir a 250 mg/ml, siendo un valor muy alto, lo cual indica que se necesita mayor cantidad de miel inmadura para lograr un efecto similar al de la

miel madura, colectada por el productor o envasado. Es importante notar que atípicamente una muestra de miel colectada tuvo acción inhibitoria a 250 mg/ml (Figura 5).

La concentración bactericida mínima fue menor a 75 colonias en 125 mg/ml en la miel madura, colectada por el productor y envasado, las pequeñas diferencias mostradas no fueron significativas ($H=2,619$, $p=0,270$). Mientras que la miel inmadura necesitó un promedio de 311 mg/ml, para lograr un efecto bactericida parecido al de la miel madura, colectada por el productor y envasado por el productor. En los experimentos de concentración bactericida mínima se tuvo un resultado sin algún efecto en la miel madura, miel colectada por el productor y envasada por el productor, sin embargo, en la miel inmadura se tuvo cuatro resultados sin algún efecto, es decir no hubo inhibición de colonias bacterianas ($H=2,619$, $p=0,270$).

Tabla 4. Diferencia en los componentes principales de muestras de miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019.

Miel de abeja	Componentes Principales			
	1	2	3	4
Madura aséptica	0,137	<u>-0,657</u>	0,392	-0,629
Inmadura aséptica	0,081	0,289	0,911	0,283
Colectada por el productor	0,232	<u>0,689</u>	-0,027	-0,686
Envasado por el productor	<u>0,960</u>	-0,097	-0,127	0,232
% de Varianza	68,28	23,59	7,84	0,28
% de Varianza acumulada	68,29	91,88	99,72	100,00

Tabla 5. Número de colmenas por comunidad y especies de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019.

Cuenca	Comunidad	Especie	Nº de colmenas
Río Nanay	Santa Rita	Melipona eburnea	6
		Melipona grandis	7
	San Pedro	Melipona eburnea	2
Río Ucayali	Bagazán	Melipona eburnea	6
	Chingana	Melipona eburnea	4
		Melipona grandis	5
Total			30

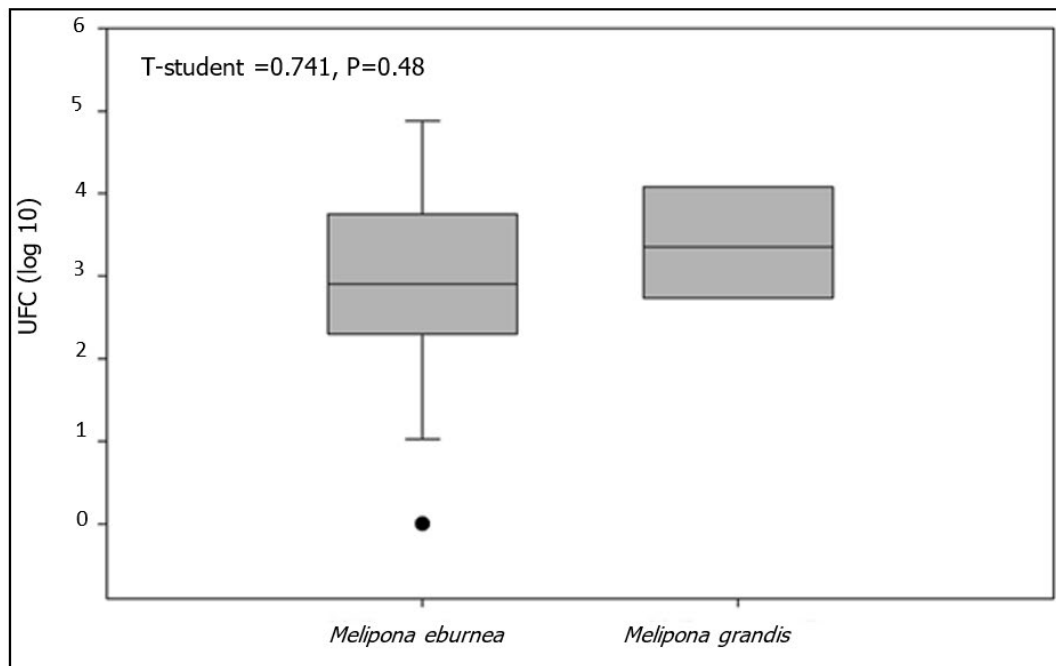


Figura 3. Comparación de unidades formadoras de colonias de bacterias aerobias mesófilas viables por especie de abeja sin agujón en Loreto, Perú, 2019.

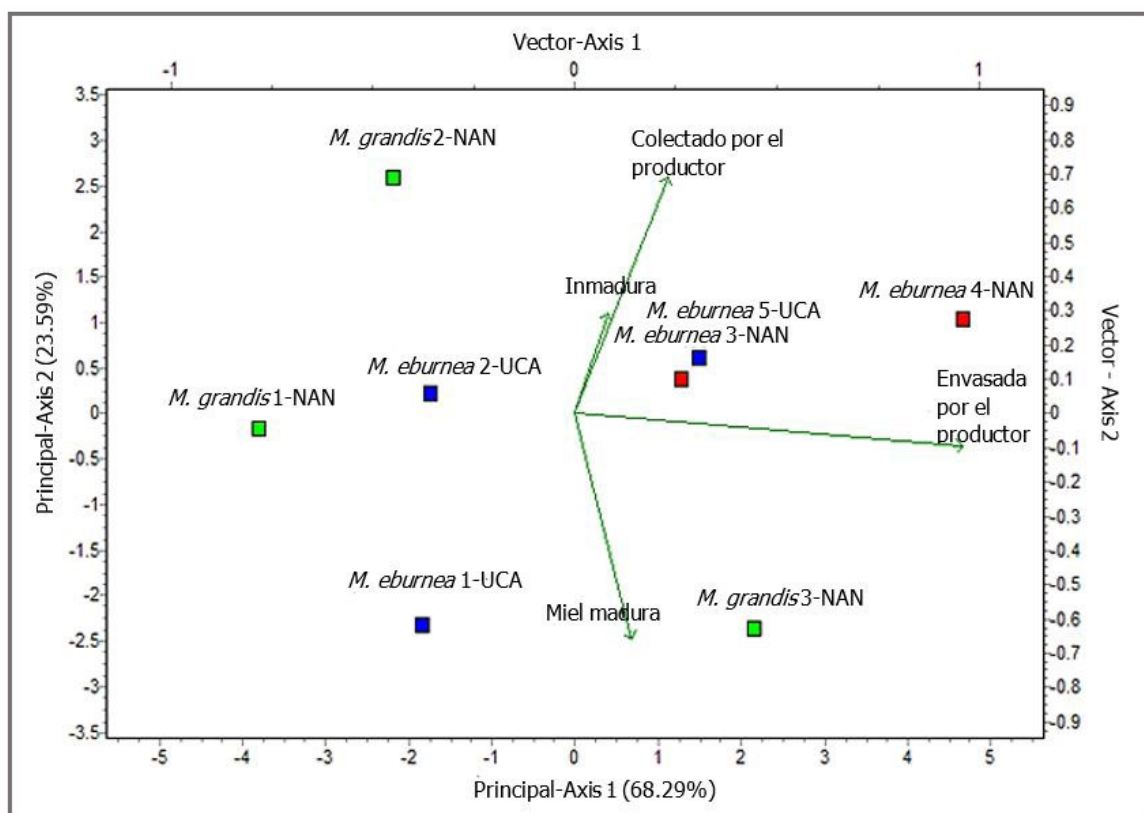


Figura 4. Análisis de componentes principales de acción bactericida por lugar de muestreo de miel de abeja sin agujón en Loreto, Perú, 2019.

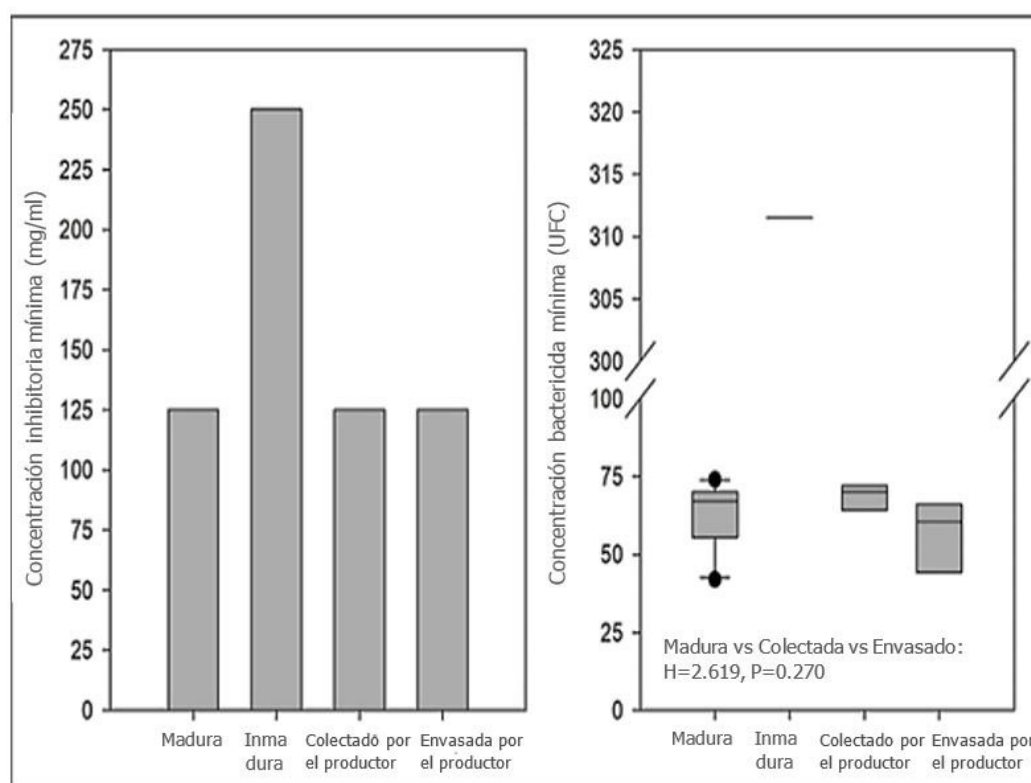


Figura 5. Valores de concentración inhibitoria y bactericida mínima de la miel de abeja sin aguijón en Loreto, Perú, 2019.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten explicar que la miel de abeja producida por especies de *Meliponas eburnea* y *Melipona grandis* posee carga bacteriológica en su contenido, debido a la manipulación inadecuada durante el proceso de extracción y envasado, sin embargo, presenta un efecto inhibitorio bacteriano siendo estudiadas en nuestras evaluaciones de tiempo de supervivencia, capacidad antibacteriana consecuente a las concentraciones inhibitoria mínima y bactericida mínima sobre el crecimiento de *Escherichia coli* drogorresistente, esta cepa fue empleada por su importancia en el área de la salud pública, por lo que su potencial uso medicinal a nivel hospitalario demostrado en nuestros resultados puede ser prometedor para salvaguardar la salud de la población.

En un estudio realizado por Fontes *et al.* (2013) sobre contaminación bacteriana, afirman que existe contaminación por parte del meliponicul-

tor cuando no tienen buenas prácticas de manufactura en el momento de recolección; lo que concuerda con nuestro estudio ya que determinamos la existencia de la contaminación de la miel en el proceso de extracción y envasado; Sánchez *et al.* (2012) también menciona que el proceso de producción realizada artesanalmente carece de tecnología que garantice un alimento inocuo listo para el consumo humano, ante ello nuestros resultados muestra que la miel madura y la miel envasada contiene una carga bacteriana de 800 UFC y 10 000 UFC de bacterias aerobias mesófilas viables, lo cual estaría dentro del límite permisible establecido en la norma sanitaria en Perú (MINSA, 2008), del VI ítem de azúcares mieles y productos similares; así como del ICONTEC (2012), presentando como parámetros de 10^3 a 10^4 UFC; sin embargo, teniendo un resultado como 800 UFC (8×10^2) de la miel madura, estaría por debajo del recuento para bacterias aerobias mesófilas viables, la que indicaría que mientras sea menor la carga bacteriana resultaría un producto más eficaz, cabe mencionar que esta norma estable-

cida es en base a mieles producidas por abejas del género *Apis*, esta referencia se tomó para la investigación como productos similares de esta normativa peruana, ya que Grajales-Conesa et al. (2018) y Souza et al., (2006), mencionaron sobre la no existencia de una regulación para mieles producidas por abejas sin aguijón en distintas regiones del mundo, así mismo Ormeño et al. (2021) indica que los parámetros que establece la legislación peruana para *Apis mellifera* no son adecuadas para algunas variables analizadas, donde es necesario estandarizar los lineamientos para la miel de abeja sin aguijón. Por otro lado en el estudio realizado no se encontró diferencias significativas entre las mieles de las especies evaluadas de *Melipona eburnea* y *Melipona grandis*, sin embargo se mostró una sutil diferencia en *M. eburnea*, debido a que no se encontró colonias bacterianas en una muestra analizada a diferencia de *M. grandis* que si se encontró en todas las muestras de mieles, esta evidencia puede deberse a lo indicado por Zamora (2011), que las muestras de las mieles son dependientes de su origen de la fuente del néctar, así como del área geográfica, esta información también puede ser corroborado por Roubik (1989), en la que hace mención la dependencia de las características del ambiente como la distribución y abundancia de diferentes tipos de recursos, adicionales a las características específicamente florales que contribuye a la capacidad antimicrobiana del contenido de la miel, es decir, que la miel producida por *M. grandis* está relacionado su capacidad antimicrobiana con la fuente de recursos que encontró en tierra firme en el Nanay, y *M. eburnea* tuvo más recursos florales por que fue muestreado tanto en tierra firme como en zona inundable

Respecto a la estimación del tiempo de supervivencia de *E. coli* drogorresistente, se encontró estudios realizados de supervivencia del mismo agente patógeno en otros productos de consumos como las frutas y verduras, donde esta bacteria logró una supervivencia promedio de 72 horas (Castro et al., 2004). Otros estudios han demostrado que determinadas especies de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, en particular *E. coli* como bioindica-

dor de contaminación de origen fecal (Pucciarelli et al., 2014) capaces de resistir hasta 34 días en miel de *Apis mellifera* (Coll et al., 2008). En nuestros resultados, *E. coli* drogorresistente logra sobrevivir hasta las 32 horas en promedio, donde se podría comprobar que la miel de abeja sin aguijón resulta ser más eficaz.

Los resultados obtenidos por Cabrera et al. (2006) respecto a la capacidad antibacteriana de la miel, reportan mayor sensibilidad de cepas de *E. coli*, frente a mieles que fueron evaluadas a partir de mieles zulianas (Zulia, Venezuela), así mismo Fangio et al. (2007) observaron la presencia de halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* los valores de halos formados fueron superiores de 20 mm de diámetro, así mismo Ewnetu et al. (2013), muestran que el mayor tamaño de halo de inhibición es de 22,27 mm. En nuestra investigación todas las muestras evidenciaron halos de inhibición donde el mayor diámetro obtenido fue de 11,74 mm en miel envasada por el productor, habiéndose empleado en la prueba bacteriológica cepas resistentes a los antimicrobianos en comparación de los estudios realizados por Cabrera et al. (2006) Fangio et al. (2007) y Ewnetu et al. (2013) donde no emplearon cepas drogorresistente. En la actualidad la resistencia de esta bacteria a los antimicrobianos es elevada (Puig et al., 2014), y nuestros resultados muestra que las mieles de abeja sin aguijón son activas frente a *E. coli* drogorresistente.

La concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima, en muestras de mieles evaluadas nos indicó un efecto inhibitorio sobre *E. coli* drogorresistente equivalentes a 125 mg/ml, este dato de la concentración inhibitoria mínima coincide con el reporte presentado por Sherlock et al. (2010). Ewnetu et al. (2013) reporta que la concentración inhibitoria mínima es de 6,25 mg/ml y concentración bactericida mínima 125 mg/ml. Mientras que, Estrada et al. (2005) mencionan que la miel de abeja logra inhibir a *E. coli* en concentraciones al 100 % mas no diluida, por otro lado, Rahman et al. (2013) indica que la miel de abeja sin aguijón no logró inhibir el crecimiento de *E.*

coli a 375,0 mg/ml. En nuestras evaluaciones la miel diluida podría compararse con las muestras de miel inmaduras donde se necesitó un promedio de 311 mg/ml, es decir se necesita cuatro veces más de concentración de miel inmadura para lograr un efecto bactericida parecido al de la miel madura, siendo la miel inmadura la menos adecuada para inhibir esta bacteria. Las diferencias de resultados podrían ajustarse al efecto del periodo de almacenamiento y al calor sobre las propiedades fisicoquímicas y estudio del efecto antibacteriano de la miel sobre *E. coli* (Badawy et al., 2004).

La aparición de cepas resistentes contra los antimicrobianos es una realidad que se fue probando en los últimos años, siendo *E. coli* implicado con más frecuencia (García-Hernández et al., 2011) llevando consigo la búsqueda de tratamientos alternativos lo que condujo al redescubrimiento de la miel de abeja dada sus propiedades antimicrobianas y su notable efecto desinflamatorio y cicatrizante, no obstante estas propiedades medicinales fueron reconocidas desde tiempos antiguos (Cooper et al., 2002), de modo que al ser un producto de origen animal se debe considerar la carga bacteriana (Zamora y Arias, 2011). La importancia de los resultados expresados en la investigación reafirma las propiedades medicinales pese a la carga bacteriana presente en su composición, aportando información específica en mieles producidas por abejas sin aguijón.

A futuro, es indispensable desarrollar una regulación para mieles producidas por abejas sin aguijón, ya que en su composición presenta una carga microbiana baja, tal como menciona Estrada et al. (2005), donde las muestras presentaron recuentos iguales o menores de 10^2 UFC siendo equivalentes a nuestros resultados, esto se debe a que los microorganismos en la miel no encuentran características óptimas para multiplicarse, sin embargo cuando los recuentos son altos probablemente se debe a una contaminación por una manipulación inadecuada durante y después de la extracción de la miel, la razón por la cual no se debe detener la di-

vulgación por diferentes medios informativos y prácticos para llegar a buenas prácticas con los productores de miel de abeja. Por otro lado, es necesario generar estudios respecto a los recursos florales colectadas por meliponas para la producción de miel, donde se estudiaría el contenido medicinal y su eficacia en ella, también es necesario llevar a cabo estudios minuciosos sobre el uso de agentes terapéuticos para bacterias resistentes a los medicamentos después de la estandarización farmacéutica y los ensayos clínicos, finalmente seguir con estudios respecto a mieles monoflorales producidas por meliponidos ya que existe la dependencia de las características del ambiente en su distribución y abundancia, estos resultados mostrarían el éxito del origen del efecto antibacterial.

AGRADECIMIENTO

A los pobladores de las comunidades Santa Rita, San Pedro, Bagazán y Chingana, por su hospitalidad y apoyo en los trabajos de campo. Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica –FONDECYT-, por el financiamiento del proyecto “Mejoramiento de la cría y manejo artesanal de abejas nativas en el departamento de Loreto”, al biólogo Kember Mejía Carhuanca por el impulso a la presente investigación, y al biólogo Pedro Pérez Peña por la orientación estadística del estudio desarrollado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Badawy, O., Shappii, S., Tharwat, E., Kamal, A. (2004) Antibacterial Activity of Bee Honey and its Therapeutic Usefulness Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* Infection. *Science Technology Magazine International Epiz*, 23 (3): 1011-1022.
- Cabrera, L., Cespedes, E., Nava, R., Ojeda G. (2006) Actividad Antibacteriana No-Peroxido de Mieles Zulianas. *Revista Científica*, 16 (5): 556-563.

- Castañeda, J., Ortega, J. (2014) La supervivencia de los gérmenes intrahospitalarios en superficies inanimadas. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 27 (107): 394-396.
- Castro, N., Chaidez, C., Carrasco, W., Valdez, B. (2004) Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. Ciudad de La Habana. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, México. *Revista Cubana Salud Pública*, 30 (1): 83-6
- Codex Alimentarius. (2019) *Norma para la miel CXS 12-1981*. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, Organización Mundial de la Salud. Roma, Italia.
- Coll, F., Villat, C., Laporte, G., Noia, M., Mestorino, N. (2008) Características microbiológicas de la miel. *Artículos de Investigación*, 3 (2): 29-34.
- Cooper, R., Molan, P., Harding, K. (2002) The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *Journal of applied microbiology*, 93 (5): 857-863.
- Estrada, H., Gamboa, M., Chaves, C., Arias, M. (2005) Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 55 (2): 167-171.
- 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 (1): 1-7.
- Fangio, M., Iurlina, M., Fritz, R. (2007) Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. *Revista Argentina de Microbiología*, 39 (2): 120-123.
- Fonte, L., Díaz, M., Machado, R., Demedio, J., García, A., Blanco, D. (2013) Caracterización físico-química y organoléptica de miel de *Melipona beecheii* obtenida en sistemas agroforestales. *Pastos y Forrajes*, 36 (3): 345-349.
- García-Hernández, AM., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, JA. (2011) Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de B-lactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24 (2): 57-66.
- Grajales-Conesa, J., Vandame, R., Santiesteban-Hernández, A., López-García, A., Guzmán-Díaz, M. (2018) Propiedades físico-químicas y antibacterianas de mieles de abejas sin aguijón del sur de Chiapas, México. *Ibciencias*, 1 (1): 1-7.
- ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación) (2007). *Miel de abeja*. Norma Técnica Colombiana. 1273. Bogotá, Colombia.
- INS (Instituto Nacional de Salud) (2011). *Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias*. 8. Ministerio de salud. Lima, Perú.
- Mazariegos, A. (2006) *Determinación de la actividad de la enzima diastasa y análisis microbiológico en miel producida en la finca el guardabarranco, municipio de pastores, Departamento de Sacatepequez* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- MINSA (Ministerio de salud) (2008). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. 591. Ministerio de salud. Lima, Perú.
- Ormeño, J., Castillo, T., Garay, R., Vallejos, G. (2021) Calidad de miel por "abejas nativas" (*Meliponini*) en la región de San Martín, Perú. *Arnaldoa*, 28 (1): 139-148.
- Pérez, C., Fuencisla, J. (1985) Manejo y alteraciones de la miel. *Hojas divulgadoras del ministerio de agricultura, pesca y alimentación*, 13 (85): 3-15.

- Pucciarelli, A., Schapovaloff, M., Kummritz, S., Seňuk, S., Brumovsky, L., Dallagnol, A. (2014) Microbiological and physicochemical analysis of yateí (*Tetragonisca angustula*) honey for assessing quality standards and commercialization. *Revista Argentina de Microbiología*, 46 (4): 325-332.
- Puig, Y., Leyva, V., Apórtela, N., Campos, N., Frerer Y., Soto, P. (2014) Serogrupos y resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas en alimentos procedentes de brotes de enfermedades diarreicas. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 24 (2): 161-171.
- Radwan, S., El-Essawy, A., Sarhan, M. (1984) Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances against microorganisms. *Zentralblatt fur Mikrobiologie*, 139 (4): 249-255.
- Rahman, M. M., Richardson, A., Sofian-Azirun, M. (2010) Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (18): 1872-1878.
- Roubik, D. (1989) *Ecology and natural history of tropical bees*. 1ra ed. New York: syndicate of the university of Cambridge.
- Sánchez, O., Castañeda, P., Muños, G., Tellez, G. (2012) Aportes para el análisis del sector apícola colombiano. *Journal of Agricultural science and Technology*, 2 (4): 469-483.
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., Humphreys, H. (2010) Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC. Complementary and alternative medicine*, 10 (1): 1-5.
- Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., et al. (2006) Composición de la miel abejas sin aguijón: estableciendo requisitos de calidad. *Inter-ciencia*, 31 (12): 867-875.
- Zamora, L., Arias, M. (2011) Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomédica*, 22 (2): 59-66.

Conflicto de interés

Los autores de la presente investigación y publicación del artículo declaramos que no incurrimos en conflictos de intereses.

