



## REVISIÓN

### Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de microorganismos en la miel de abeja

#### Molecular diagnosis as alternative for detection of microorganisms in honey bee

Liliany Rojas García, Carlos Ariel Yadró García, Anais Rodríguez Luis

1 Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI), Carretera de El Cano a El Chico, Km 0, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba

\*lrojaslili95@gmail.com



#### Palabras clave

*Apis mellifera*  
estatus racial  
Varroosis  
africanización

#### Keywords

*Apis mellifera*  
Racial status  
Varroosis  
africanization

**Editor:** Daylen Guanche,  
CIAPI, Cuba

**Recibido** Marzo 1, 2022

**Aceptado** Marzo 27, 2022

**Copyright:**© This work by  
Rojas et al. is licensed under  
[CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

#### Como citar este artículo:

Rojas, L., Yadró, C. A., Rodríguez, A. (2022). "Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de microorganismos en la miel de abeja". *Apiciencia* 24 (1).

Contrario a los microorganismos que componen la microbiota propia de la miel, los microorganismos contaminantes, pueden ocasionar enormes pérdidas económicas como resultado del deterioro del producto. La calidad de este producto, está influenciada por microorganismos patógenos, principalmente levaduras, y bacterias formadoras de esporas. Los métodos convencionales de detección de microorganismos incluyen el empleo de medios de cultivo. A pesar de que esta metodología no es costosa requiere tiempo para la lectura de los resultados. En la actualidad el empleo de Reacción en Cadena de la Polimerasa y sus variantes han ido ganando terreno como herramientas útiles para la detección de microorganismos en la miel. Siendo ampliamente usados debido a su alta especificidad, sensibilidad, y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras.

Contrary to the microorganisms that make up the honey's own microbiota, contaminating microorganisms can cause enormous economic losses as a result of product deterioration. The quality of this product is influenced by pathogenic microorganisms, mainly yeasts, and spore-forming bacteria. Conventional methods of detecting microorganisms include the use of culture media. Although this methodology is not expensive, it requires time to read the results. Currently, the use of Polymerase Chain Reaction and its variants have been gaining ground as useful tools for the detection of microorganisms in honey. Being widely used due to its high specificity, sensitivity, and ability to process large amounts of samples.

## Introducción

La apicultura es una actividad que contribuye al desarrollo económico y social del país. La miel como su principal producto debe cumplir con ciertas características físico-químicas, organolépticas y microbiológicas para ser considerada apta para el consumo y para su comercio (Ramos et al, 2019).

La miel producida por las abejas de la especie *Apis mellifera* está compuesto de una mezcla compleja de carbohidratos, y de pequeñas cantidades de proteínas, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, pólenes y cera. Este producto apícola, además, presenta una microbiota propia al igual que el resto de los productos alimenticios, con un comportamiento microbiológico característico (Barroso-Arévalo et al, 2019; Vázquez et al, 2018; Grosso, 2001). La microbiota propia de la miel es introducida por la abeja en la colmena a través del néctar, polen, o durante el grooming (Salamanca Grosso, G, 2001) y los microorganismos que la componen no daña la salud humana.

La baja actividad de agua, pH ácido, peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos, entre otros son características intrínsecas de la miel le permiten inhibir el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos. La miel no es bactericida, sino bacteriostático (Guadalupe et al, 2019) y su capacidad de inhibición varía dependiendo de la fuente floral del néctar utilizado para elaborarla. Factores externos como el clima y la manipulación por parte del humano también pueden influir en su capacidad inhibidora (Ramos et al, 2019; Suárez, Mato, Huidobro, Simal, & Sancho, 2002; Taormina, Niemira, & Beuchat, 2001) y en la proliferación de microorganismos contaminantes.

Contrariamente a los microorganismos que componen la microbiota propia de la miel, los microorganismos contaminantes pueden ocasionar enormes pérdidas económicas como resultado del deterioro del producto. Además, algunos patógenos resultan extremadamente difíciles de eliminar de los alimentos lo que puede originar diversas enfermedades en los consumidores (Herrera et al, 2006).

El proceso de contaminación puede tener lugar en varias etapas de la elaboración de la miel (Aguillón et al, 2013), lo cual puede conducir a la recolección y obtención de un producto final con baja inocuidad y calidad. Los microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) afectan la calidad de estos productos y disminuye su venta en el mercado. La lucha contra estos microorganismos requiere de procedimientos adecuados y de inspección sanitaria. En este sentido, el desarrollo de métodos cada vez más rápidos y efectivos para la detección e identificación de bacterias y hongos nocivos en

la cadena productiva es de mucha importancia.

Las técnicas de identificación de ETA basadas en el cultivo y en las características fenotípicas de las bacterias son laboriosas y pueden requerir varias semanas para obtener resultados. La aplicación de métodos de detección independientes de cultivo, como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una valiosa alternativa molecular recomendada para la detección de microorganismos debido a su gran especificidad, sensibilidad y menor tiempo. Sin embargo, esta metodología aún requiere validación internacional (Herrera et al, 2019).

Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este trabajo fue realizar una recopilación bibliográfica de los microorganismos normales y contaminantes de la miel, así como la utilidad, ventajas y desventajas de las herramientas moleculares como método de identificación de estos microorganismos en la miel, las nuevas tendencias en su uso para el diagnóstico y los esfuerzos actuales tendientes a su estandarización internacional.

### Microbiota habitual

La microbiota normal de la miel comprende bacterias del género *Bacillus*, tanto en estado esporulado como en sus formas vegetativas. Dichos microorganismos no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana. (Tabla 1).

Los mohos que se encuentran en algunas mieles, pertenecen fundamentalmente a los géneros *Penicillium* y *Mucor*. En cuanto a las levaduras, las especies más frecuentes son *Saccharomyces bisporus variedad mellis*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii variedad osmophilus*, los cuales son microorganismos osmófilos o sacrofilos. Otros agentes encontrados pertenecerían a los géneros *Schizosaccharomyces* y *Torula* (Agusto 2019, Namine et al, 2019).

### Microbiota contaminante

La miel comercialmente vendida contiene un mínimo de contaminación microbiana, la cual puede contaminarse en forma primaria a partir de microorganismos provenientes del polen, del tracto digestivo de las abejas, del medio ambiente o del néctar, o de manera secundaria a partir de prácticas no totalmente higiénicas ocurridas durante la manipulación de la misma. La calidad de este producto, está influenciada por microorganismos patógenos, principalmente levaduras, y bacterias formadoras de esporas (Alippi et al; 2019, Molan, 1992a, 1992b; Mundo et al., 2004; Snowdon y Cliver, 1996). Dichas bacterias han sido descritas como las principales fuentes de contaminación del tracto digestivo de larvas y abejas adultas, de los panales de cría, polvo ambiental, aire, tierra, superficies de polen, néctar y flores (alippi et al; 2019, Gilliam, 1979, 1997;

Gilliam y Perst, 1978; Gilliam y Valentine, 1976).

Además, existe la posibilidad de contaminación de la miel a partir de hongos del tipo *Acosphaera apis* (Orden Acosphaerales) y *Acosphaera major* (Modesto et al; 2015). Adicionalmente, se ha reportado la presencia de *Bettsya alvei* o moho del polen, el cual se encuentra en la miel en forma de esporas.

Adicionalmente, se ha reportado la presencia de *Bettsya alvei* o moho del polen, el cual se encuentra en la miel en forma de esporas.

**Microorganismos pertenecientes a la familia Entero-**

**Tabla 1.** La comunidad de bacterias aeróbicas formadoras de esporas reportadas en la miel (Alippi, 1995; Alippi et al, 2004; Alippi y Abrahamovich, 2019; Iopez et al, 2019; Evans y Amstronmg, 2006; Snowdon y Cliver, 1996; Wen et al, 2017, Alippi et al, 2019).

<b>género Bacillus</b>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Bacillus badius,</i>
	<i>Bacillus cereus sensu lato</i>
	<i>Bacillus circulans,</i>
	<i>Bacillus clausii</i>
	<i>Bacillus firmus</i>
	<i>Bacillus flexus</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus megaterium</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Bacillus simplex</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Brevibacillus borstelensis</i>
	<i>Brevibacillus brevis</i>
	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	
<b>género Paenibacillaceae</b>	<i>Paenibacillus apiarius</i>
	<i>Paenibacillus larvae</i>
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> y <i>Rummeliibacillus stabekisii</i>

bacteriaceae y Clostridiaceae como Salmonella y Clostridium Sulfioreductores, respectivamente, también han sido detectados en la miel (Collins, C.H. y col., 1999). Además han sido encontradas en la miel, esporas de C. botulinum tipo G, aunque en bajos niveles, (Monetto, A y col., 1999). La presencia de esporas de este clostridio es en especial peligrosa para bebés y niños de corta edad (Centorbi, 1999), siendo causante del Botulismo infantil.

También se han detectado otros microorganismos patógenos para el hombre como Staphylococcus aureus y B. cereus. La legislación exige la ausencia total de microorganismos patógenos o toxinas patógenas, así como la ausencia de Enterobacteriaceae, Escherichia coli y Salmonella y Shigella.

**Identificación de microorganismos en la miel**

Los métodos convencionales de detección de microorganismos requieren que la bacteria a detectar forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual es en sí mismo una de las limitantes de estos métodos. La detección de microorganismos mediante cultivo no implica una gran inversión económica ni gasto en material excesivo. Sin embargo, necesita mano de obra suficiente para la preparación de los medios de cultivo apropiados y el registro de resultados. De modo que se requieren varios días antes de la obtención del resultado (Rodríguez et al, 2009).

**Reacción en cadena de la polimerasa**

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología mole-

cular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como herramienta de identificación y cuantificación (Rojas et al, 2006). En la actualidad se han realizado numerosos estudios donde se emplea la PCR como alternativa para la identificación de microorganismos en la

miel (Tabla 2) ( Rossi et al , 2018, López et al, 2019, Rojas et al 2006).

Las herramientas moleculares basadas en PCR constituyen uno de los métodos más ampliamente usados debido a su alta especificidad, sensibilidad, y capacidad de procesa-

**Tabla 2.** Identificación de microorganismos en la miel mediante métodos moleculares.

Microorganismos	Métodos empleados	Referencia
Clostridium botulinum Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli Salmonella enteritidis Listeria monocytogenes	PCR	Zamora et al, 2011
género Bacillus	PCR	Alvarez 2012
Paenibacillus larvae	qPCR	Franca et al, 2018
Bacillus Brevibacillus, Lysinibacillus,	PCR	López et al ,2019
Coliformes totales	PCR	Ramos 2019
Clostridium botulinum	PCR-ELISA, PCR	Hielm et al, 1998; Fach et al, 2002 y Nevas et al, 2002
Bacillus Brevibacillus, Paenibacillus larvae Lysinibacillus, Rummeliibacillus	PCR-RFLP	López et al, 2018
Paenibacillus larvae Melissococcus plutonis Ascosphaera apis	PCR multiplex	Maldonado et al, 2018
Coliformes totales	PCR	Ramos et al, 2019
Paenibacillus larvae	PCR	Silva et al, 2017

miento de grandes cantidades de muestras. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica la secuencia blanco de ADN durante varios ciclos (Tamaya el at, 2013). En esta metodología un factor clave es la correcta selección de la secuencia blanco a amplificar. Esta secuencia debe permitir la identificación del microorganismo de interés de forma específica, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN (microorganismos concomitantes o la muestra misma). Las diferencias en la secuencia de genes ortólogos pueden servir como herramienta útil en la tipificación de diferentes cepas y serotipos de una misma especie o de especies cercanas filogenéticamente (Rojas et al, 2006). La PCR muestra parámetros de sensibilidad y especificidad analíticas válidos para

la detección de microorganismos en la miel, (López et al ,2019).

#### **Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real y PCR Multiplex**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR), como su nombre lo indica permite registrar o detectar la secuencia de ADN amplificada en tiempo real mediante el empleo de una molécula fluorescente. De modo que no se requiere la evaluación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, a diferencia de la PCR convencional. Entre las moléculas fluorescentes más empleadas se encuentran el SYBR Green y las sondas de hidrólisis (TaqMan) (Leal 2011).

Una de las ventajas más grandes que tiene esta variación de la PCR es la realización en condiciones libres de contaminación y poco o nada manipulación del operario en el caso de ser automatizado el ensayo (Kubista, 2006). Además, en comparación con la PCR convencional esta variante genera resultados que pueden ser cuantificados siempre que la calidad del ADN amplificado sea el adecuado. Adicionalmente, aporta mayor sensibilidad y seguridad para el operario al evitar el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio (Gómez et al, 2011) (Butler, 2007). La qPCR según la norma ISO 16140 del 2003 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) es un método de cribado alternativo para la evaluación de patógenos en alimentos (Huertas et al, 2019).

La PCR multiplex es una técnica que permite la detección simultánea de diferentes fragmentos de ADN en una misma mezcla de reacción. De modo que esta técnica permite identificar la presencia de diferentes microorganismos en una misma muestra.

Entre los factores que limitan la aplicación de la PCR en la identificación de microorganismos patógenos en muestras de alimentos destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción en muestras de alimentos, clínicas y ambientales ha sido reportada por varios autores ( Fach et al, 2002; Nevas et al, 2002; Ymamada et al, 1999; Lindstrom et al; 2001). Entre los compuestos identificados que ejercen un efecto negativo sobre la PCR se encuentran los polisacáridos, las grasas, proteínas e iones metálicos presentes en las matrices alimenticias (Rossen et al, 1992). Además, algunas sales usadas comúnmente en los protocolos de extracción de ácidos nucleicos también pueden inhibir la PCR (Al-Soud et al, 2001).

Debido a la alta concentración de carbohidratos (al menos 80% de azúcar) (Pineda et al, 2019), la miel es una matriz muy compleja y el aislamiento del ADN no es una tarea fácil, los azúcares copurificados con ADN objetivo podrían inhibir la polimerasa utilizada en la amplificación por PCR (Olivieri et al, 2012). Por lo que todo protocolo debe optimizarse para garantizar una cantidad suficiente de ADN libre de sustancias inhibitorias de PCR.

### Conclusiones

La disminución de la contaminación e infección por patógenos en la miel de abeja es una de las prioridades en la comercialización a nivel mundial. El control microbiológico estricto en la cadena de producción de alimentos y disponer de pruebas confiables, rápidas e internacionalmente aceptadas para la determinación de microorganismos pató-

genos, no patógenos o que disminuyen la calidad de la misma, dañando su valor a nivel de mercado es imprescindible. Se ha demostrado a lo largo de los años que la amplificación del ADN mediante la PCR y todas sus variantes, es una herramienta poderosa en el diagnóstico microbiológico permitiendo la identificación de numerosos microorganismos propios y contaminantes de la miel.

Sin embargo, su empleo en la industria alimenticia es limitado. Su uso aún necesita mayor investigación y desarrollo de metodologías para alimentos específicos.

### Referencias Bibliográficas

1. A.C. López and A.M. Alippi, Feasibility of using RFLP of PCR amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey, *Journal of Microbiological Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105690>
2. A.C. López and A.M. Alippi, Feasibility of using RFLP of PCR amplified 16S rRNA gene(s) for rapid differentiation of isolates of aerobic spore-forming bacteria from honey, *Journal of Microbiological Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105690>
3. Al-Soud W, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485-493.
4. Álvarez, K. A. V. (2012). Caracterización de cepas de *Bacillus* aisladas de muestras de miel y de colmena mediante la secuenciación del gen Ribosomal 16S (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile). Arcos Farfán, Liseth Juliana, Análisis Físico Químico De La Miel De Abeja Clase II. Machala : Universidad Técnica De Machala, 2016
5. Augusto, C. T. J. (2019). Efecto de tres diluciones y dos tipos de levaduras sobre los parámetros sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos en la elaboración de hidromiel (doctoral dissertation, universidad agraria del ecuador).
6. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Jöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J, et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:150-155.
7. Barroso-Arévalo, S., Fernández-Carrión, E., Goyache, J., Moleiro, F., Puerta, F., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2019). High load of deformed wing virus and *Varroa destructor* infestation are related to weakness of honey bee colonies in southern Spain. *Frontiers in microbiology*, 10, 1331.
8. Blackburn, C y McClure, P. Introduction. En: Blackburn, C y McClure, P. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002. p. 3-12.
9. Bonilauri P, Bardasi L, Leonelli R, Ramini M, Luppi A, Giacometti F, et al. Detection of food hazards in foods: comparison of

- real time polymerase chain reaction and cultural methods. *Ital J Food Saf [Internet]*. 2016 [cited 2016 Oct 15];5(1).
10. Carlos Huertas-Caro<sup>1</sup>, Eliana Urbano-Cáceres<sup>1\*</sup>, María Torres-Caycedo<sup>1</sup>, *Molecular diagnosis: an alternative for the detection of pathogens in food*, *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, AÑO 2019 18(3) MAYO-JUNIO ISSN 1729 - 519X
  11. Centorbi, H. J., Aliandro, O. E., Demo, N. O., Dutto, R., Fernandez, R., & Puig de Centorbi, O. N. (1999). First case of infant botulism associated with honey feeding in Argentina. *Anaerobe*, 5(3-4), 181-183.
  12. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa Rafael Antonio Rojas-Herrera, Tania González-Flores\*
  13. Emma Letchera and Davida S. Smytha, *Hitchhikers in Honey: An investigation of the inhibitory mechanisms of bacteria found in honey*, 2019
  14. Espín, L., Vázquez, B., Schencke, C., Sandoval, C., & del Sol, M. (2020). Reparación de Lesiones Musculares por Incisión Quirúrgica Coadyuvada con una Formulación Basada en Miel Nativa (Ulmoplus®). *Estudio Experimental en Modelo Animal de Conejo (Oryctolagus cuniculus)*. *International Journal of Morphology*, 38(2), 492-498.
  15. Evans, J. D., & Armstrong, T. N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC ecology*, 6(1), 4.
  16. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5870-5876.
  17. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 5870-5876.
  18. Franca Rossi 1,\* , Carmela Amadoro 2, Addolorato Ruberto 1 and Luciano Ricchiuti 1, *Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) Paenibacillus larvae Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris*, 16 November 2018
  19. Franca Rossi 1,\* , Carmela Amadoro 2, Addolorato Ruberto 1 and Luciano Ricchiuti, *Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) Paenibacillus larvae Targeted Assays and Definition of Optimal Conditions for Its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris*, 16 November 2018
  20. Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2011;45(3):441-5.
  21. Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2011;45(3):441-5.
  22. Grosso, G. S. (2001). *Estudio analítico comparativo de las propiedades fisicoquímicas de mieles de apis mellifera, en algunas zonas apícolas de los departamentos de boyaca y tolima (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València)*.
  23. Guadalupe, R., & Viviana, E. (2019). *Determinación de coliformes totales en miel de abejas en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha, Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: UCE)*.
  24. Huertas-Caro, C., Urbano-Cáceres, E., & Torres-Caycedo, M. (2019). *Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 513-528.
  25. Leal CAG. *Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergentes para a aquicultura nacional. [Tesis Doctoral]*. *Universidad Federal de Lavras*; 2011. [Citado 2016 Oct 3].
  26. Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5694-5699.
  27. López, A. C., & Alippi, A. M. (2019). *Feasibility of using RFLP of PCR-amplified 16S rRNAs for rapid differentiation of aerobic spore-forming bacteria from honey*. *Journal of Microbiological Methods*, 2019.
  28. Luis Gabriel Zamora, María Laura Arias, *Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón*, *Rev Biomed* 2011; 22:59-66
  29. Maldonado Yaguana, G. A. (2018). *Estandarización de una PCR múltiple para la identificación de tres patógenos en abejas del Ecuador (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2018)*.
  30. María Alejandra Aguillón Márquez, Claudia Hernández y Ana Ruby Correa, *Caracterización Microbiológica en miel de Apis mellifera y Tetragonisca angustula*, 2014
  31. María Luisa Carrillo-Inungaray Rocío Crystabel López González, Brenda Alvarado Sánchez Mayra Aguilar Zárate, *Comparación de los métodos fenotípico y molecular para identificación de patógenos en alimentos*. 2011 *Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca Universidad Autónoma de San Luis Potosí maluisa@uaslp.mx*
  32. Monetto, A. M., Francavilla, A., Rondini, A., Manca, L., Siravegna, M., & Fernandez, R. (1999). A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe*, 5(3-4), 185-186.
  33. Namini, Z. N., Mousavi, M. H., Mahmoudi, R., & Hassanzadeh, P. (2018). *Hygienic quality of the honey samples produced in the Iran in comparison with international stan-*

- dards. *International Food Research Journal*, 25(3), 982-988.
34. Nevas M, Hielm S, Lindström M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 2002; 72: 45-52
  35. Nora Mestorino, F. Coll Cárdenas, Maria Cecilia Villat, Gladys Laporte, *Características microbiológicas de la miel*, 2008
  36. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):535-46.
  37. Pineda Ballesteros, E., Castellanos Riveros, A., y Téllez Acuña, F. R. (2019). Determinantes fisicoquímicos de la calidad de la miel: una revisión bibliográfica. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 16(83). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr16-83.dfc>
  38. Pineda Ballesteros, E., Castellanos Riveros, A., y Téllez Acuña, F. R. (2019). Determinantes fisicoquímicos de la calidad de la miel: una revisión bibliográfica. *Cuadernos de Desarrollo Rural*, 16(83). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cdr16-83.dfc>
  39. R. Subramanian, H. Umesh Hebbar & N.K. Rastogi (2007) *Processing of Honey: A Review*, *International Journal of Food Properties*, 10:1, 127-143, DOI: 10.1080/10942910600981708 To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10942910600981708>
  40. Ramos GG, Sánchez CAN, Gallaguer HS, Rodríguez PMA, Morales ZE, Chan RMS, *Wounds Treated with Honey. Clinical Cases, Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 2017; 15 (4)
  41. Ramos Guadalupe Erika Viviana, *Determinación de coliformes totales en miel de abejas en el cantón mejía de la provincia de pichincha, ecuador* 2019
  42. Rojas Herrera, Rafael Antonio; González Flores, Tania *Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa Bioquímica*, vol. 31, núm. 2, abril-junio, 2006, pp. 69-76
  43. Rossen L, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen O. Inhibition of PCR by components of food samples, microbiological diagnosis assays and DNA-extraction solutions. *J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
  44. Rubio Zaragoza, M., Sopena Juncosa, J. J., & Carrillo Poveda, J. M. (2017). *Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento autólogo en asociación con Células Madre Mesenquimales derivadas de grasa en el tratamiento de heridas experimentales en el conejo/tesis doctoral presentada por Deborah Chicharro Alcántara; dirigida por [el] Dr. Joaquín J. Sopena Juncosa,[la] Dra. Mónica Rubio Zaragoza,[y el] Dr. José María Carrillo Poveda.*
  45. Snowdon, J. A., & Cliver, D. O. (1996). Microorganisms in honey. *International journal of food microbiology*, 31(1-3), 1-26.
  46. Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J. F., Simal-Lozano, J., & Sancho, M. T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955(2), 207-214.
  47. Tamara García López, Airam Cabrera Rodríguez, Raquel Jiménez Anero, Jesús Alberto Martín González, Ana Campos Serrano, Isabel María Rodríguez Rodríguez *La miel como método para el tratamiento de heridas*, 2018
  48. Tamay de Dios L, \* Ibarra C, \*\* Velasquillo C\* 2013 *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*
  49. Tamay de Dios L, \* Ibarra C, \*\* Velasquillo C\*, *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*, Vol. 2, Núm. Mayo-Agosto 2013 pp 70-78
  50. Taormina, P. J., Niemira, B. A., & Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International journal of food microbiology*, 69(3), 217-225.
  51. Wen, Y., Wang, L., Jin, Y., Zhang, J., Su, L., Zhang, X., ... & Li, Y. (2017). The microbial community dynamics during the vitex honey ripening process in the honeycomb. *Frontiers in microbiology*, 8, 1649.
  52. Yamada S, Ohashi E, Agata N, Venkateswaran K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1483-1490.
  53. Yépez Álvarez Bryan Renán, Mosquera Andrade Jorge Adalberto, *Determinación de la presencia o no de Bacillus cereus sensu lato en miel de abejas de apiarios del cantón Mejía de la provincia de Pichincha*. 2019
  54. Zamora, L. G., & Arias, M. L. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista biomédica*, 22(2), 59-66.