



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Caracterización microbiológica de muestras de miel
procedentes de Mozambique

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Güerri Gericó, Ángela

Tutor/a: Botella Grau, M^a Salud

Cotutor/a: Escriche Roberto, M^a Isabel

Director/a Experimental: GARCIA FERRUS, MIGUEL

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

**Caracterización microbiológica de muestras de miel procedentes de
Mozambique**

TRABAJO FIN DE GRADO EN:

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Alumna: Dña. Ángela Güerri Gericó

Directora Académica/Tutora: Dra. Salut Botella Grau

Cotutora: Dra. Isabel Escriche Roberto

Director Experimental: Miguel García-Ferrús

Curso Académico: 2021-2022

Caracterización microbiológica de muestras de miel procedentes de Mozambique

Resumen

La calidad de la miel se define por sus características físicas, químicas, sensoriales y microbiológicas y, al tratarse de un alimento natural, presenta una microbiota característica propia que puede modificarse por las condiciones higiénicas de manipulación durante los procesos de extracción, envasado o conservación.

El criterio microbiológico de aceptabilidad de la miel en España se ha modificado con el tiempo. En la actualidad solamente se recoge el control de *Listeria monocytogenes*, aunque se reconoce como uno de los alimentos que se han vinculado con el botulismo infantil. Es por ello que se debería actualizar qué parámetros microbiológicos tendrían que controlarse y así también se cumpliría con el objetivo 3 de Salud y Bienestar para garantizar una vida sana (ODS-OMS).

En este trabajo se han analizado 28 muestras de miel procedentes de distintas regiones de Mozambique (Manica, Sofala, Nampula y Zambezia). Los parámetros valorados han sido la disponibilidad de agua (a_w), humedad relativa (HR) y se han cuantificado las poblaciones de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, aerobios esporulados, anaerobios sulfito-reductores, así como la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

Según nuestros resultados, recomendaríamos revisar los parámetros a controlar en la miel como ausencia de aerobios sulfito-reductores y limitar la disponibilidad de agua (a_w) y las poblaciones de aerobios mesófilos, aerobios esporulados y mohos y levaduras.

Los resultados del ANOVA mostraron que las mieles de las cuatro regiones difieren significativamente respecto a a_w , HR, aerobios mesófilos y aerobios esporulados, pero no existen diferencias en cuanto a la población de mohos y levaduras.

Palabras clave: miel, microbiota, aerobios mesófilos, mohos, levaduras, esporulados, sulfito-reductores *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

Alumna: Dña. Ángela Güerri Gericó

Directora Académica/Tutora: Dra. Salut Botella Grau

Directora Académica/Cotutora: Dra. Isabel Escriche Roberto

Director Experimental: Miguel García-Ferrús

València, julio de 2022

Microbiological characterization of honey samples from Mozambique

Abstract

The quality of honey is defined by its physical, chemical, sensory, and microbiological characteristics and, being a natural food, it has its own characteristic microbiota that can be modified by the hygienic conditions of handling during the extraction, packaging or preservation processes.

The microbiological criteria for the acceptability of honey in Spain have been modified over time. At present, only the control of *Listeria monocytogenes* is included, although it is recognized as one of the foods that have been linked to infant botulism. That is why it should be updated which microbiological parameters would have to be controlled and thus would also meet goal 3 of Health and Well-being to ensure a healthy life (SDG-WHO).

In this work, 28 honey samples from different regions of Mozambique (Manica, Sofala, Nampula and Zambezia) were analyzed. The parameters assessed were water availability (a_w), relative humidity (HR) and the populations of mesophilic aerobes, molds and yeasts, sporulated aerobes, sulfite-reducing anaerobes, as well as the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*.

According to our results, we would recommend revising the parameters to be controlled in honey as the absence of sulfite-reducing aerobes and limiting water availability (a_w) and the populations of mesophilic aerobes, sporulated aerobes and molds and yeasts.

ANOVA results showed that honeys from the four regions differed significantly with respect to a_w , HR, mesophilic aerobes and sporulated aerobes, but there were no differences with respect to the population of molds and yeasts.

Keywords: honey, microbiota, mesophilic aerobes, molds, yeasts, sporulated, sulfite-reducing, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

Author: Ángela Güerri Gericó

Academic director/Tutor: Dra. Salut Botella Grau

Academic director/Co-tutor: Dra. Isabel Escriche Roberto

Experimental director: Miguel García-Ferrús

Valencia, July 2022

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras y profesoras Salut Botella Grau e Isabel Escriche Roberto por permitirme hacer el trabajo con ellas, por su gran dedicación y paciencia y por todo lo que me han enseñado.

También me gustaría mencionar a todas las personas que trabajan en el laboratorio de Microbiología de la Universitat Politècnica de València, en especial a Miguel García Ferrús y a Ana González Pellicer, por ayudarme siempre que he tenido problemas o dudas.

Me gustaría mencionar a todos mis amigos y a mi familia por haberme apoyado en todo momento y confiar en mí.

Este trabajo ha sido financiado por el programa ADSIDEO 2020 del Centro de Cooperación al Desarrollo de la Universitat Politècnica de Valencia a través de Proyecto titulado: "Análisis de Riesgos en productos apícolas de Mozambique. Oportunidad Social y Económica de las poblaciones rurales". La parte experimental de este trabajo se ha realizado en el Centro avanzado de Microbiología de Alimentos (CAMA).

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	Inocuidad alimentaria	3
2.	Calidad de la miel y criterio microbiológico.....	4
3.	Actividad de agua (a_w).....	5
4.	Aerobios mesófilos.....	5
5.	Mohos y levaduras	6
6.	Aerobios esporulados.....	6
7.	Anaerobios sulfito-reductores	6
8.	<i>Salmonella</i> spp.....	7
9.	<i>Listeria monocytogenes</i>	7
II.	OBJETIVOS	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	9
1.	Tratamiento de las muestras	9
2.	Recuento de aerobios mesófilos.....	10
3.	Recuento de mohos y levaduras	10
4.	Recuento de aerobios esporulados.....	11
5.	Recuento de anaerobios sulfito-reductores	11
6.	Protocolo de aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	12
6.1	Análisis de las muestras	12
7.	Protocolo de aislamiento e identificación de <i>Listeria</i>	14
7.1	Análisis de las muestras	14
8.	Análisis estadístico	17
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
1.	Recuento de aerobios mesófilos.....	20
2.	Recuento de mohos y levaduras	20

3.	Recuento de aerobios esporulados.....	21
4.	Recuento de anaerobios sulfito-reductores	22
5.	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. por métodos culturales	22
6.	Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> por métodos culturales	23
7.	Análisis estadístico de resultados de los parámetros por provincias.....	23
V.	CONCLUSIONES	27
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de miel por país. Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2020).	1
Figura 2. Mapa de Mozambique por provincias. Fuente: López y col., 2017.	2
Figura 3. Tasas de incidencia de botulismo en España (casos por 100.000 habitantes). Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Botulismo 2012-2018 (RENAVE, 2022).	3
Figura 4. Ejemplo de diagrama Box-Whisker. Fuente: Romero y Zúnica, 1993.	17
Figura 5. Muestra 3. Colonias de aerobios mesófilos en Plate Count Agar (PCA).	20
Figura 6. Muestra 20. Colonias de mohos y levaduras en Sabouraud Dextrose Agar con Cloranfenicol (SDA-C).	21
Figura 7. A) Muestra 3 y B) Muestra 24. Colonias de esporulados en Triptófano Desaminasa Agar (TDA). ..	21
Figura 8. A) Muestra 23 y B) Total de muestras positivas. Sulfito-reductores en agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS).....	22
Figura 9. Análisis comparativo entre los valores de disponibilidad de agua (a_w) y las diferentes provincias.	25
Figura 10. Análisis comparativo entre los valores de Humedad Relativa (HR) y las diferentes provincias. ..	25
Figura 11. Análisis comparativo entre los recuentos de aerobios mesófilos (log UFC/g) y las diferentes provincias.....	26
Figura 12. Análisis comparativo entre los recuentos de aerobios esporulados (log UFC/g) y las diferentes provincias.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución del criterio microbiológico de la miel en España (elaboración propia).	5
Tabla 2. Muestras estudiadas.	9
Tabla 3. Composición del medio Plate Count Agar (PCA).	10
Tabla 4. Composición del medio Sabouraud Dextrose Agar con Cloranfenicol (SDA-C).	10
Tabla 5. Composición del medio Triptófano Desaminasa Agar (TDA).	11
Tabla 6. Composición del medio Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS).	12
Tabla 7. Composición del caldo Rappaport Vassiliadis (RVS).	12
Tabla 8. Composición del caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (MKKTn).	13
Tabla 9. Composición del medio Xilosa Lisina Desoxilato (XLD).	13
Tabla 10. Composición del medio cromogénico de Salmonella.	14
Tabla 11. Composición del caldo Fraser.	15
Tabla 12. Composición del medio Agar de Listeria conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA).	16
Tabla 13. Composición del medio PALCAM.	16
Tabla 14. Características de las muestras de miel estudiadas.	18
Tabla 15. Valores medios (y desviación estándar), mínimos y máximos de los parámetros disponibilidad de agua (a_w) Humedad Relativa (HR), aerobios mesófilos, mohos y levaduras y aerobios esporulados, de las muestras de miel de diferentes provincias de Mozambique.	24

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

AESAN Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

ALOA Agar de *Listeria* conforme a Ottaviani y Agosti

API® Galerías estandarizadas y miniaturizadas de test bioquímicos

APPCC Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos

APT Agua de peptona tamponada

A_w Actividad de agua

ELIKA Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria

CCAA Comunidades Autónomas

h Hora

HR Humedad relativa

H₂S Ácido sulfhídrico

ISO International Organization for Standardization

MKTTn Caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina

mL Mililitro

mm Milímetros de agua

OMS Organización Mundial de la Salud

PCA Plate Count Agar

RD Real Decreto

Ref. Referencia

RENAVE Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica

RTCA Reglamento Técnico Centroamericano

RVS Caldo Rappaport-Vassiliadis con soja

SDA Sabouraud dextrose agar

SPS Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina

TDA Agar Triptófano desaminasa

TI Tasa de Incidencia por 100.000 habitantes

Tm Toneladas de miel

TSI Triple Sugar Iron

UFC Unidades formadoras de colonias

XLD Agar-xilosa-lisina-desoxicolato

I. INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento nutritivo, saludable y natural producido por las abejas. Sus propiedades beneficiosas van más allá del uso como dulcificante, ya que es rico en sales minerales, enzimas, vitaminas y proteínas que le donan propiedades nutritivas y organolépticas únicas. Puede ser monofloreal, si predomina un porcentaje predeterminado de néctar y polen de una planta concreta, o plurifloreal, si contiene una mezcla no concreta de distintos néctares y pólenes. En función de las condiciones ambientales, geográficas y climáticas, la miel puede variar en el contenido de polen y humedad relativa. La miel se produce en los cinco continentes y su consumo varía de un país a otro según cultura y hábitos alimentarios (FAO, 2020).

La composición de la miel puede variar en función del néctar, las condiciones climáticas y el origen floral, y en general contiene:

- Carbohidratos: son el principal constituyente de la miel y están formados por un 45-60 % de glucosa y fructosa, un 5-15 % de sacarosa, 0,5-2,8 % de maltosa, 0,5-1 % de isomaltosa, 0,5-1,5 % de turanosa y 0,2-1 % de nigerosa.
- Agua: el contenido general de agua es del 20 %, aunque puede variar de 23-25 %, valores a partir de los que pueden aparecer fermentaciones.
- Otros: el contenido de ácidos orgánicos es del 0,6 % y dan a la miel un pH ácido. También destacan los compuestos nitrogenados con un 0,4 % y los minerales con un 0,1 % (Zandamela, 2008).

Cada uno de sus componentes tiene propiedades nutricionales y medicinales únicas que actúan sinérgicamente. Por ello, durante la historia, se ha ido dejando constancia de la importancia que tiene la miel y de los numerosos usos que se han dado. Entre ellos destacan las propiedades curativas y antioxidantes y la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antidiabética que han hecho que se haya convertido en un producto indispensable.

La producción mundial de miel se calcula en 1.770.119 toneladas de miel (Tm). La República Popular China es el mayor productor de miel con una producción anual de 466.487 toneladas (**Figura 1**), seguido por Turquía que ocupa el segundo lugar con 104.077 toneladas de producción anual. Con 74.403 toneladas Argentina es el tercer mayor productor y España con 30.513 toneladas de producción por año se clasifica el decimotercero (FAOSTAT, 2020).

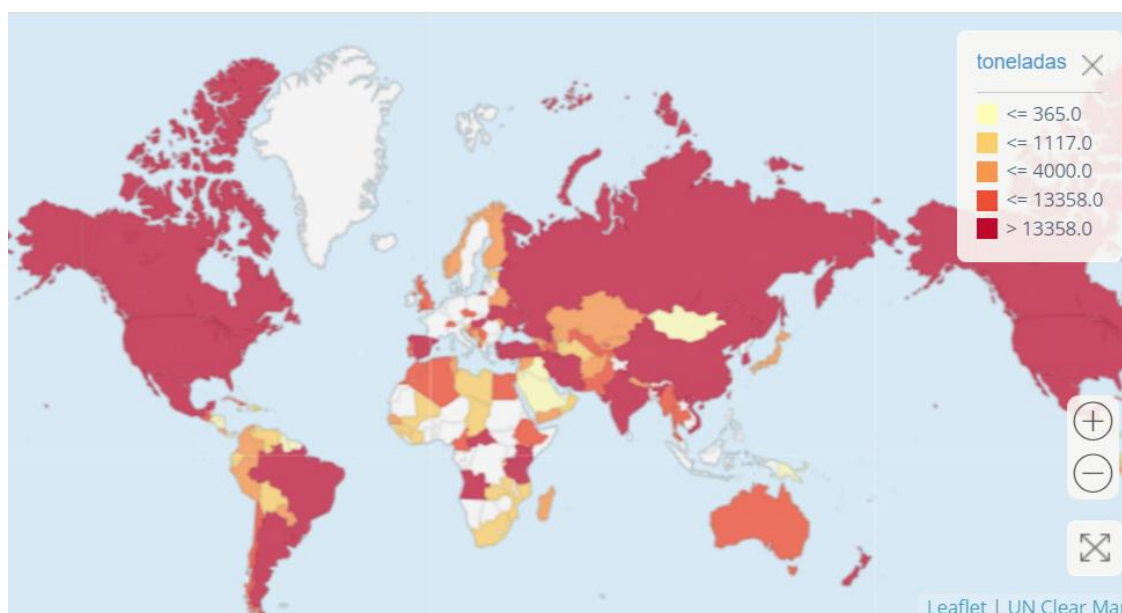


Figura 1. Producción mundial de miel por país. Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT, 2020).

El orden de producción por continentes fue Asia con 842.830 toneladas, Europa con 388.902 toneladas, América con 346,770 toneladas, África con 150.911 toneladas y Oceanía con 40.706 toneladas (FAOSTAT, 2020).

Mozambique es un país de África cuya capital es Maputo, tiene una superficie de 799.380 Km², una población de 30.832.244 habitantes y la producción anual de miel fue de 607 toneladas (FAOSTAT, 2020; Datosmacro, 2022). La apicultura en Mozambique es una actividad con una extensa tradición y tiene una importancia significativa para las zonas rurales, pues se trata de un proyecto provechoso basado en un medio natural no destructivo para el medio ambiente y que sirve de fuente de ingresos para la población, como marca el Objetivo 1 para el Fin de la pobreza, dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de Naciones Unidas (2015). Además, las regiones ubicadas en el norte y centro de Mozambique (**Figura 2**) poseen un clima favorable, tropical, caracterizado por dos estaciones diferenciadas: la estación fría y seca que es de mayo a septiembre y la caliente y húmeda, entre octubre y abril. Cuenta con amplias zonas forestales ricas en flora melífera, lo que permite elaborar mieles con características propias, haciendo que la comercialización del producto en estos países juegue un papel importante (Tanlenque-Alberto y Escriche, 2015).

Desde el punto de vista de producción apícola, podemos diferenciar cuatro regiones centrales, entre otras, cada una de ellas presenta especies diferentes de árboles de flora melífera:

- Manica. Localizada en el centro de Mozambique con una precipitación media de > 1000 milímetros de agua (mm). El clima es suave, cálido y templado. Se caracteriza por ser una región con vegetación tipo sabana, con árboles y arbustos con un gran potencial para la elaboración de miel artesanal, cuyo proceso de elaboración consiste en la utilización de los troncos de los árboles.
- Sofala. Localizada en el centro con una precipitación media de > 1000 mm. Se caracteriza por un clima tropical, con veranos muy lluviosos.
- Nampula. Localizada en el norte de Mozambique con una precipitación media de aproximadamente 2000 mm/año. Se caracteriza por un clima tropical, con veranos muy lluviosos.
- Zambezia. Localizada en el centro con una precipitación media mayor que 2000 mm/año. Se caracteriza por un clima tropical, con veranos mucho más lluviosos (Climate-Data, 2022).



Figura 2. Mapa de Mozambique por provincias. Fuente: López y col., 2017.

1. Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria se refiere a todos aquellos riesgos asociados a la alimentación que pueden incidir en la salud de las personas, tanto riesgos naturales, como originados por contaminaciones, por incidencia de patógenos, o bien que puedan incrementar el riesgo de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras. Se trata de una condición necesaria para que exista una seguridad alimentaria (FAO, 2022).

Los alimentos pueden contaminarse en cualquiera de las etapas de la cadena alimentaria como la producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, envasado, transporte o almacenamiento o por una contaminación medioambiental. Normalmente, tiene un impacto negativo sobre la calidad de los alimentos y puede llegar a causar problemas en la salud humana, por lo que el nivel de los contaminantes debe encontrarse bajo niveles aceptables desde el punto de vista toxicológico, así como para garantizar el funcionamiento del mercado interior dentro de la Unión Europea (AESAN, 2022).

Los productos apícolas se encuentran regidos por leyes, directivas y reglamentos que se han establecido, entre otros objetivos, para proteger la inocuidad del producto dentro del mercado. El CODEX Alimentarius resguarda la salud de los consumidores mediante la fijación de estándares internacionales para poder garantizar buenas prácticas en el comercio de alimentos contribuyendo así a la seguridad alimentaria (Verde, 2014).

Aunque la miel es un alimento seguro para adultos, se trata de uno de los alimentos que se han vinculado con el botulismo infantil y que con mayor frecuencia aparece como responsable de la enfermedad en los casos en los que se logra identificar el origen de las esporas. Los datos epidemiológicos actuales permiten considerar que el riesgo de padecer botulismo es bajo en niños menores de 12 meses si se evita el consumo de miel y/o infusiones de especies vegetales (AESAN, 2011).

En 2017 se notificaron ocho casos de botulismo (cinco confirmados, dos probables y uno sospechoso) relacionados con el consumo de alimentos y agua, lo que supuso una Tasa de Incidencia (TI) anual de 0,02 (**Figura 3**). Las comunidades autónomas (CCAA) que notificaron los casos fueron Cataluña, Baleares, Andalucía, Madrid y La Rioja. Seis de los casos tenían entre 53 y 74 años y dos de ellos eran menores de un año, en los que se determinó botulismo de tipo intestinal. En el año 2018 se notificaron doce casos (cuatro confirmados, tres probables y cinco sospechosos), lo que supuso una TI anual de 0,03. Las CCAA que notificaron los casos fueron Castilla y León, Cataluña, Asturias, Aragón, C. Valenciana y Extremadura. Once de los casos tenían entre 14 y 68 años y el otro fue un niño de seis meses, en el que se detectó también botulismo de tipo intestinal. De los ocho casos declarados de botulismo en España en 2017 seis fueron de origen alimentario y de los doce casos declarados en 2018, diez fueron alimentarios (RENAVE, 2022).

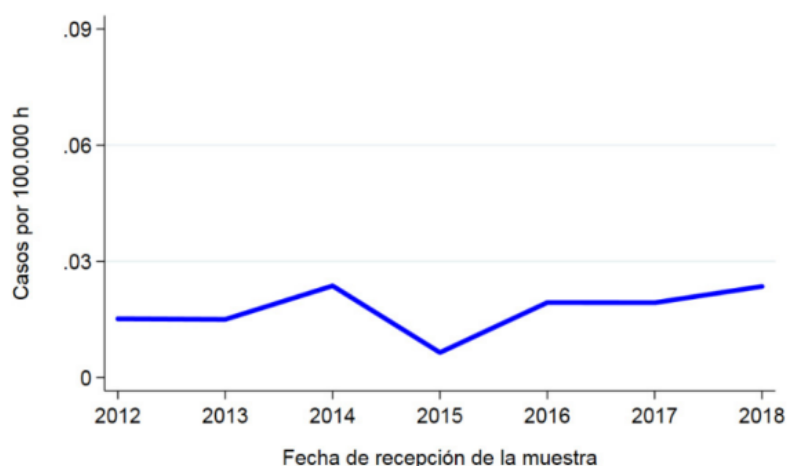


Figura 3. Tasas de incidencia de botulismo en España (casos por 100.000 habitantes). Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Botulismo 2012-2018 (RENAVE, 2022).

2. Calidad de la miel y criterio microbiológico

La calidad de la miel está determinada por sus características sensoriales, químicas, físicas y microbiológicas. Se trata de un producto muy estable debido a su baja actividad de agua ya que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo. Como todo producto de origen natural, las mieles de *Apis mellifera* presentan una microbiota propia con un comportamiento microbiológico característico (Salamanca y col., 2000). Su microbiota habitual está constituida por microorganismos que no tienen acción negativa sobre la miel y no son peligrosos para la salud humana, como diversas especies de bacilos, mohos o levaduras. Sin embargo, la miel puede contaminarse a partir de microorganismos provenientes del polen, del tracto digestivo de las abejas, del medio ambiente o por unas prácticas poco higiénicas durante su manipulación, que pueden aportar una contaminación secundaria por la presencia de gérmenes patógenos como puede ser la *Salmonella* (Coll y col., 2018). Esta contaminación se puede reducir mediante la aplicación de buenas prácticas de higiene y un sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) con los que se puede controlar el proceso de la cadena de producción y así garantizar la Salud y Bienestar, marcados en el Objetivo 3 de los ODS (Naciones Unidas, 2015).

En el Reglamento de la Comunidad Europea (CE) 2073/2005 y sus modificaciones se especifican los criterios microbiológicos para alimentos y en el artículo 2 de este reglamento se recoge la definición de criterio microbiológico que se describe como «el criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos y/o en la cantidad de toxinas/metabolitos por unidad de masa, volumen, superficie o lote».

Pueden distinguirse dos tipos: los criterios de seguridad alimentaria, que son aquellos que definen la aceptabilidad de un producto o un lote de productos alimenticios y son aplicables a los productos comercializados, y los criterios referentes a la higiene del proceso, aquellos que indican el funcionamiento aceptable del proceso de producción, estableciendo el valor de contaminación indicativo por encima del cual se requieren medidas correctoras para mantener la higiene del proceso conforme a la legislación.

Cada criterio recoge los protocolos para poder realizar la toma de muestras y su posterior análisis de los resultados. Respecto al criterio de seguridad alimentaria se deben controlar microorganismos y toxinas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Cronobacter* spp., *Escherichia coli*, enterotoxinas estafilocócicas e histamina. En el criterio donde se define la higiene del proceso, se deben tener en cuenta algunas bacterias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, enterobacterias, *Campylobacter* spp., estafilococos coagulasa positivo, *Bacillus cereus* y el recuento de colonias aerobias (EUR-Lex, 2005).

El criterio microbiológico de la miel ha cambiado con el tiempo. En la Orden 5/8/83 (BOE 13/8/83) se requería un control de aerobios mesófilos, de enterobacterias y *Escherichia coli* por gramo de muestra, de *Salmonella* y *Shigella* por 25 gramos de muestra, el control de mohos y levaduras, de *S. aureus*, estreptococos fecales, y de otras toxinas y gérmenes patógenos. Posteriormente, en el Real Decreto (RD) 1049/2003 (BOE 5/8/2003) modificados por el RD 473/2015 para el etiquetado, se deroga la norma anterior y no se recoge ningún criterio microbiológico. Actualmente, el Reglamento CE 2073/2005 modificado por el Reglamento CE 1441/2007 para productos comercializados durante su vida útil, incluye la miel dentro de los alimentos en los que la determinación analítica regular de *Listeria* es de poca utilidad, aunque es el único parámetro que recoge. En la **Tabla 1** se detallan los límites establecidos en la legislación española.

Tabla 1. Evolución del criterio microbiológico de la miel en España (elaboración propia).

	Orden 5/8/83 (BOE 13/8/83)	RD 1049/2003 (BOE 5/8/2003)	R. CE 2073/2005 modificado por R. CE 1441/2007
Aerobios mesófilos	10 ⁴ UFC/g	No recoge normas microbiológicas	-
Enterobacterias coliformes	Ausencia		-
<i>E. coli</i>	Ausencia		-
<i>Salmonella-Shigella</i>	Ausencia		-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-		N=5; c=0 10 ² UFC/g
Mohos y levaduras	Mohos: 10 ² UFC/g		-
Otros microorganismos	Toxinas y gérmenes patógenos: Ausencia		-

De la normativa en otros países, cabe destacar el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:17 de 2017, sobre los criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos en Centroamérica, que recoge como parámetro a controlar el recuento de anaerobios sulfito-reductores con un máximo permitido de 10 UFC/g (COMIECO, 2022) o la Resolución 1057 de 2010 en Colombia que establecía un máximo de 10² UFC/g (Palacio, 2010). No existe legislación africana acerca de la miel.

3. Actividad de agua (a_w)

Todos los alimentos contienen una cantidad determinada de agua, una parte de ella conforma la estructura molecular del alimento y la otra se encuentra en forma libre o disponible (a_w), que es la que permite el crecimiento microbiano y participa en las reacciones químicas y enzimáticas y en los procesos de deterioro. Este parámetro, junto con la temperatura, el pH y el oxígeno, influye en la estabilidad de los alimentos y, por tanto, en su vida útil (Talens, 2022).

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes límites de a_w para la miel. Entre ellos se destacan las recomendaciones de la Comunicación II de las Jornadas Científicas sobre la alimentación española de 1991 con un límite de 0,582 o las de Early de 1996 de 0,56 y recogidas en la última recopilación de Criterios microbiológicos para alimentos de Moragas y Valcárcel de 2021. Otros autores como Belitz y Grosch (1997) establecieron un valor de 0,6 como límite para la miel de buena calidad y 0,7 como límite aceptable (Mossel y col., 2003; Moragas y Valcárcel, 2021). Más permisivos son los límites de Sagua en 2017 para el que un valor de a_w menor de 0,75 inhibe el crecimiento bacteriano, pero permite el crecimiento de algunas levaduras y mohos.

En cuanto a la humedad relativa (HR), Early (1996) recomendaba un valor del 23 % pero el RD 1049/2003 recoge un límite más restrictivo, 20 %.

4. Aerobios mesófilos

La población de microorganismos aerobios mesófilos en un alimento es uno de los indicadores microbiológicos de calidad higiénica del alimento y resulta un parámetro de gran importancia porque indica si las etapas que conforman el tratamiento, transporte y almacenamiento de los alimentos, se han realizado correctamente. Permite informar acerca de la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil, la descongelación incontrolada o los fallos de mantenimiento de las temperaturas de refrigeración (Ferrer y Morales, 2005; Obregón y Zambrano, 2017).

Un recuento elevado de aerobios mesófilos en miel se relaciona con malas condiciones de extracción o con la contaminación durante la cosecha y la manipulación, reduciendo su estabilidad y calidad (Manzo, 2012).

5. Mohos y levaduras

La contaminación por hongos en un alimento tiene gran importancia no solo por el deterioro que causan, si no por la capacidad que tienen algunos de ellos para producir micotoxinas y generar infecciones y reacciones alérgicas en los consumidores.

Los mohos y levaduras son un grupo de microorganismos propios de la miel que crecen con gran rapidez en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, causando importantes pérdidas por alteración.

Los mohos aislados en algunas mieles pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Mucor*, aunque también se han identificado casos de contaminación con esporas de *Bettsya alvei* o moho del polen, y que únicamente causa problemas cuando hay un aumento de la humedad debido a un mal almacenamiento.

En cuanto a las levaduras, la mayoría de ellas pertenecen al género *Sacharomyces* y son las principales responsables de la fermentación cuando el porcentaje de humedad es cercano al 21 %. La miel debido a su elevada concentración de azúcar permite el desarrollo de levaduras osmofílicas provenientes de las flores del entorno, del equipo utilizado en las operaciones de extracción y de las condiciones de envasado (Coll y col., 2018).

6. Aerobios esporulados

Los microorganismos aerobios esporulados se encuentran muy difundidos en la naturaleza y gracias a sus esporas logran sobrevivir muchos años en condiciones ambientales adversas. Algunas de las alteraciones que pueden causar en los alimentos son la fermentación simple, la producción de gas y la de ácido y gas.

Las bacterias presentes en la miel son, fundamentalmente, del género *Bacillus*, sobre todo sus esporas, aunque también se pueden encontrar formas vegetativas. Se trata de microorganismos que normalmente no tienen una acción negativa sobre la salud, sin embargo, pueden encontrarse algunos patógenos para las abejas, como *Bacillus larvae* o *Bacillus alvei* (Coll y col., 2018).

7. Anaerobios sulfito-reductores

Los microorganismos anaerobios crecen en condiciones muy bajas de oxígeno y algunos únicamente en su ausencia. Suelen encontrarse en la parte interna de los alimentos no procesados y su valoración sirve como indicador de contaminación debido a esporas resistentes (Periago, 2022).

Algunos de estos microorganismos son peligrosos para la salud del consumidor, entre los que se pueden destacar *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*, causante del botulismo infantil en niños de entre 1 y 52 semanas de edad, pacientes inmunodeprimidos o con enfermedad inflamatoria intestinal y cuya dosis mínima infectiva está comprendida entre 10 y 100 esporas. Cuando las esporas llegan al intestino del niño, germinan y la forma vegetativa libera neurotoxinas que impiden que se libere la acetilcolina, neurotransmisor encargado, entre otras funciones, de la contracción y relajación muscular (AESAN, 2011; SEIMC, 2022).

Los principales alimentos implicados en el botulismo son las conservas de alimentos de origen animal y vegetal, los productos cárnicos y la miel (AESAN, 2011; OMS, 2022).

8. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* es viable en diferentes condiciones ambientales ya que sobrevive a la refrigeración y congelación y se destruyen por calentamiento a temperaturas superiores a 70 °C. La salmonelosis es una enfermedad transmitida a través de alimentos o agua contaminada, materiales y utensilios de cocina contaminados o por contacto directo de persona a persona (ANMAT, 2011). Entre algunos de los alimentos que tienen mayor probabilidad de contaminarse por *Salmonella* destacan ciertos tipos de carne y derivados, huevos y ovoproductos, leche y derivados sin pasteurizar o frutas y verduras crudas (AESAN, 2022).

Durante la extracción y recolección de la miel, las fuentes de contaminación principales son la manipulación incorrecta, el uso de material contaminado y, en general, unas malas prácticas en el procesado. Se ha podido detectar la presencia de bacterias del género *Salmonella* viables hasta 34 días en la miel, cuando se mantiene a 10 °C (Ferrer y Morales, 2005).

9. *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* tiene características únicas y específicas ya que tolera ambientes salinos y puede multiplicarse a temperaturas bajas entre 2 y 4 °C. Aunque la listeriosis es menos frecuente que otras enfermedades de transmisión alimentaria, la bacteria puede ingresar en las plantas de producción de alimentos a través de los manipuladores, de las superficies de contacto, equipos o del propio ambiente (AESAN, 2012). Entre algunos de los alimentos que tienen mayor probabilidad de contaminarse por *Listeria* destacan aquellos que se consumen sin tratamiento térmico previo como los productos listos para el consumo, embutidos, patés, mariscos o pescados, entre otros (ELIKA, 2021).

Durante la extracción y recolección de la miel, las fuentes de contaminación por listerias pueden producirse en la manipulación incorrecta, el uso de material con contaminado y, en general, unas malas prácticas en el procesado. Al ser una bacteria muy ubicua, puede llegar con facilidad a los animales y a las personas por distintas vías, como es la ingesta de alimentos contaminados.

II. OBJETIVOS

La miel es un alimento nutritivo, saludable y natural producido por las abejas cuyas propiedades beneficiosas van más allá del uso como dulcificante. Las toxi-infecciones alimentarias que pueden relacionarse con su consumo deberían minimizarse controlando los parámetros microbiológicos adecuados.

El objetivo principal de este trabajo ha sido **valorar la calidad microbiológica de 28 muestras de miel procedentes de cuatro regiones de Mozambique**, para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Recopilar los datos existentes sobre el criterio microbiológico de aceptabilidad de la miel en España y valorar la necesidad de establecer los parámetros necesarios para un consumo seguro, así como la relación entre estos parámetros con la disponibilidad de agua (a_w) y la humedad relativa (HR).
2. Cuantificar las poblaciones de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, aerobios esporulados y anaerobios sulfito-reductores en mieles, siguiendo las normas UNE- EN ISO relacionadas.
3. Determinar la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. y de *Listeria monocytogenes* en estas muestras siguiendo las normas UNE-EN ISO relacionadas.
4. Comparar los datos obtenidos para establecer relaciones utilizando el programa Statgraphics Centurión, a través del ANOVA simple

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tratamiento de las muestras

Se estudiaron un total de 28 muestras de miel procedentes de 4 regiones de Mozambique (Nampula, Sofala, Zambezia y Manica). El análisis de las muestras se realizó entre los meses de enero a junio de 2022 y los parámetros valorados han sido la disponibilidad de agua (a_w), la humedad relativa (HR), el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, aerobios esporulados, anaerobios sulfito-reductores, así como la presencia/ausencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. En la **Tabla 2** se detallan los códigos de las muestras analizadas, así como las características organolépticas de las mismas percibidas al observarlas en el laboratorio tras la apertura de los frascos. Los atributos se han descrito según el criterio de Valega (2022).

Tabla 2. Muestras estudiadas.

Región	Código Muestra	Atributos
Nampula	I-21220 (1)	Líquida, aroma ácido y oscura
	I-21230 (5)	Líquida y oscura
	I-21223 (11)	Líquida y oscura
	I-21217 (15)	Líquida y muy oscura
	I-21224 (17)	Líquida y clara
	I-21215 (21)	Cremada y oscura
	I-21216 (22)	Líquida y oscura
Sofala	I-21210 (2)	Líquida y clara
	I-21206 (7)	Líquida y oscura
	I-21201 (12)	Sólida y oscura
	I-21211 (13)	Sólida y clara
	I-21203 (19)	Sólida y muy clara
	I-21207 (23)	Líquida y clara
	I-21208 (28)	Sólida, clara y aromática
Zambezia	I-21190 (3)	Sólida y fermentada
	I-21192 (6)	Líquida, aromática y oscura
	I-21182 (9)	Cristalizada y clara
	I-21198 (14)	Líquida, muy aromática y oscura
	I-21185 (18)	Líquida y clara
	I-21187 (24)	Cristalizada y clara
	I-21188 (25)	Cristalizada y clara
Manica	I-21176 (4)	Sólida y clara
	I-21180 (8)	Líquida y oscura
	I-21170 (10)	Sólida y clara
	I-21175 (16)	Sólida y oscura
	I-21179 (20)	Sólida, aromática y oscura
	I-21172 (26)	Sólida y clara
	I-21174 (27)	Sólida, aromática y muy clara

2. Recuento de aerobios mesófilos

Para realizar el recuento de aerobios mesófilos de las muestras se siguió el procedimiento descrito en la norma UNE EN-ISO 4833-1:2013 “Método horizontal para el recuento de microorganismos” y la norma UNE EN-ISO 7218:2008 “Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”.

En un recipiente estéril y en condiciones de asepsia se pesó 1 gramo de muestra y se añadieron 9 mL de agua estéril y se homogeneizó manualmente. A partir de la solución preparada, se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembró en profundidad y por duplicado, un mililitro de cada dilución en “Plate Count Agar” (PCA) (Scharlau, ref. 01-161-500), atemperado a 50 °C. Una vez solidificado, se incubaron a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h.

En la **Tabla 3** se detalla la composición del medio PCA:

Tabla 3. Composición del medio Plate Count Agar (PCA).

Componente	Fórmula en g/L
Peptona caseína	5,00
Extracto de levadura	2,50
Dextrosa	1,00
Agar	15,00
pH final a 25 °C, $7,0 \pm 0,2$	

Tras el tiempo de incubación, se realizaron los recuentos de las colonias. Para ello, se calculó la media de los recuentos obtenidos en las placas expresando los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC/g).

3. Recuento de mohos y levaduras

Para realizar el recuento de mohos y levaduras de las muestras se siguió el procedimiento descrito en la norma UNE EN-ISO 8199:2018 “Requisitos y orientaciones para el examen de microorganismos mediante cultivo” y la norma UNE EN-ISO 7218:2008 “Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”.

En un recipiente estéril y en condiciones de asepsia se pesó 1 gramo de muestra y se añadieron 9 mL de agua estéril y se homogeneizó manualmente. A partir de la solución preparada, se sembró en profundidad y por duplicado, un mililitro en “Sabouraud dextrose agar” (SDA) (Scharlau, ref. 01-165-500) suplementado con “Chloramphenicol Selective Supplement” (Scharlau, ref. 06-118LYO1) y atemperado a 50 °C. Una vez solidificado, se incubaron a 30 ± 1 °C durante 48-72 h.

En la **Tabla 4** se detalla la composición del medio SDA-C:

Tabla 4. Composición del medio Sabouraud Dextrose Agar con Cloranfenicol (SDA-C).

Componente	Fórmula en g/L
D(+)-Glucosa	40,00
Peptona de caseína	5,00
Peptona de carne	5,00
Agar	15,00
Cloranfenicol	50 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, $5,6 \pm 0,2$	

Tras el tiempo de incubación, se realizaron los recuentos de las colonias. Para ello, se calculó la media de los recuentos obtenidos en las dos placas expresando el resultado en unidades formadoras de colonias (UFC/g).

4. Recuento de aerobios esporulados

Para realizar el recuento de aerobios esporulados de las muestras se siguió el procedimiento descrito en la norma UNE EN-ISO 8199:2018 “Requisitos y orientaciones para el examen de microorganismos mediante cultivo” y la norma UNE EN-ISO 7218:2007 “Requisitos generales y guía para el examen microbiológico”.

En un recipiente estéril y en condiciones de asepsia se pesó 1 gramo de muestra y se añadieron 9 mL de agua estéril y se homogeneizó manualmente. Se llevaron los tubos a un baño de 85 °C durante 1 minuto y posteriormente se llevó a inmersión en hielo durante 5 minutos.

A continuación, se procedió a la siembra de 0,1 mL en placas de agar “Tryptófano desaminasa” (TDA) (Difco, ref. 0080-17). Con ayuda de asas estériles se repartió por toda la placa y se incubaron a 30 ± 1 °C durante 48-72 h.

En la **Tabla 5** se detalla la composición del medio TDA:

Tabla 5. Composición del medio Tryptófano Desaminasa Agar (TDA).

Componente	Fórmula en g/L
Triptona	10,00
Dextrosa	5,00
Púrpura de bromocresol	0,04
Agar	15,00
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, $6,7 \pm 0,2$	

Tras el tiempo de incubación, se realizaron los recuentos de las colonias. Para ello, se calculó la media de los recuentos obtenidos en las dos placas expresando el resultado en unidades formadoras de colonias (UFC/g).

5. Recuento de anaerobios sulfito-reductores

Para realizar el recuento de anaerobios sulfito-reductores de las muestras se siguió la metodología utilizada en el laboratorio, basada en el procedimiento descrito en la norma UNE EN-ISO 7937-2004 “Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*”, la norma UNE EN-ISO 14189:2013 “Calidad del agua. Recuento de *Clostridium perfringens*. Método de filtración en membrana”, el manual “Análisis microbiológico de alimentos y control de los procesos de fabricación” y el manual de medios de cultivo para microbiología “ADSA”.

En un recipiente estéril y en condiciones de asepsia se pesó 1 gramo de muestra y se añadieron 9 mL de agua estéril y se homogeneizó manualmente.

El recuento de anaerobios sulfito-reductores se realizó en tubos con 10 mL de agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) (Scharlau, ref.01-050) atemperado a 50 °C.

Con ayuda de una punta estéril, se inoculó 1 mL de la solución en dos tubos de SPS. Para crear las condiciones necesarias de anaerobiosis, se estratificó con una capa de vaselina y se incubó en jarra de anaerobios (Oxoid, ref. OX-HP0011A) con atmósfera modificada con <0,1 % de O₂ y 7-15 % de CO₂ utilizando los sobres (Oxoid, ref. AN0035A) e incubándose a 36 ± 2 °C durante 21 ± 3 h.

En la **Tabla 6** se detalla la composición del medio SPS:

Tabla 6. Composición del medio Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS).

Componente	Fórmula en g/L
Sulfito sódico	0,50
Polimixina (B) sulfato	0,01
Sulfadiazina sódica	0,12
Peptona de caseína	15,00
Extracto de levadura	10,00
Citrato férrico	0,50
Tioglicolato sódico	0,10
Polisorbato 80	0,05
Agar	15,00
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 7,0 ± 0,2	

El agar SPS es un medio diferencial constituido por sulfito sódico y citrato férrico, que permiten la detección de los organismos sulfito-reductores, produciendo colonias negras debido a los precipitados de sulfuro de hierro (Scharlau, 2020).

6. Protocolo de aislamiento e identificación de *Salmonella*

6.1 Análisis de las muestras

La determinación de *Salmonella* se realizó según especifica la norma UNE-EN ISO 6579-1:2017 “Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp.” El procedimiento se adaptó a la cantidad disponible de las muestras con un preenriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio selectivo, siembra en medios sólidos selectivos y la confirmación de las colonias sospechosas.

Preenriquecimiento

Se pesó en condiciones de asepsia 1 gramo de la muestra en tubos con 9 mL de Agua de Peptona Tamponada estéril (APT) (Scharlau, ref. 02-277-500). Tras homogeneizar las muestras se incubaron a 34-38 °C durante 18 ± 2 h.

Enriquecimiento selectivo

Se emplearon dos medios diferentes para el enriquecimiento de salmonela. Utilizamos 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) (Difco, ref. 218581) y 10 mL de caldo Muller-Kauffmann tetracionato/novobiocina (medio líquido MKKTn) (Scharlau, ref. 02-335-500) suplementado con “Iodine-Iodine Solution” (Scharlau, ref. 064-V11108) y con dos viales de “Brilliant Green + Novobiocin Selective Supplement” (Scharlau, ref. 06-017LYO1).

En las **Tablas 7 y 8** se detalla la composición de los caldos RVS y MKKTn:

Tabla 7. Composición del caldo Rappaport Vassiliadis (RVS).

Componente	Fórmula en g/L
Digerido pancreático de caseína	4,54
Cloruro de sodio	7,20
Fosfato monopotásico	1,45
Cloruro de magnesio (anhidro)	13,40
Oxalato de verde malaquita	0,036
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 5,1 ± 0,2	

Tabla 8. Composición del caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (MKKTn).

Componente	Fórmula en g/L
Sales biliares N. °3	4,78
Extracto de carne	4,30
Peptona de caseína	8,60
Cloruro sódico	2,60
Carbonato cálcico	38,70
Tiosulfato sódico	30,50
Solución yodo-yodurada:	20 mL
Yoduro potásico	250 g/L
Yodo	200 g/L
Verde Brillante-Novobiocina:	0,1 mL
Verde brillante	10 mg
Novobiocina	40 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 8,0 ± 0,2	

Se inoculó en cada uno de los tubos 1 mL del cultivo. El RVS inoculado se incubó a una temperatura de $41,5 \pm 1$ °C durante 24 ± 3 h y el MKKTn a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 h.

Aislamiento

Para el aislamiento de *Salmonella* se sembraron dos medios de agar a partir del enriquecimiento selectivo: agar-xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) (Scharlau, ref. 01-211) y como medio complementario, el cromógeno de *Salmonella* (Oxoid, ref. CM1007), que debe ser suplementado con “*Salmonella* Selective Supplement” (Oxoid, ref. SR0194). Las placas se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 ± 3 h.

En las **Tabla 9 y 10** se detalla la composición de los medios XLD y cromógeno de *Salmonella*:

Tabla 9. Composición del medio Xilosa Lisina Desoxilato (XLD).

Componente	Fórmula en g/L
Xilosa	3,50
L-lisina	5,00
Lactosa	7,50
Sacarosa	7,50
Cloruro sódico	5,00
Extracto de levadura	3,00
Rojo fenol	0,08
Desoxicolato sódico	2,50
Tiosulfato sódico	6,80
Citrato férrico amónico	0,80
Agar	15,00
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 7,4 ± 0,2	

Tabla 10. Composición del medio cromogénico de *Salmonella*.

Componente	Fórmula en g/L
Peptona	10,00
Mezcla cromogénica	28,00
Agar	12,00
Suplemento Selectivo de <i>Salmonella</i> :	0,017
Cefsulodina	12 mg
Novobiocina	5 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 7,2 ± 0,2	

En el agar XLD las colonias típicas que crecen de *Salmonella* presentan una zona ligeramente transparente de color rojizo y pueden tener o no un centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (Scharlau, 2021). El agar cromógeno de *Salmonella* se basa en la combinación de dos sustratos cromogénicos, 5-bromo-6-cloro-3-indolil caprilato (magenta-caprilato) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D galactopiranosido (X-gal). X-gal es un sustrato para la enzima β-D-galactosidasa. La hidrólisis del cromógeno, magenta-caprilato, por especies de *Salmonella* lactosa negativas da como resultado colonias de color magenta (Oxoid, 2022).

Confirmación

Se seleccionan 5 de las colonias sospechosas aisladas en cada medio sólido selectivo para identificarlas mediante la tira API®20E.

Se siembran previamente en agar Triple Sugar Iron (TSI) (Merck, ref. 1.03915.0500), el cual permite la diferenciación de los organismos fermentadores de glucosa, lactosa y/o sacarosa, además de detectar la producción de sulfuro de hidrógeno y gas. Seguidamente, se incuban de 34 a 38 °C durante 24 ± 3 h. La gran mayoría de los cultivos típicos de *Salmonella* muestran una superficie inclinada alcalina de color rojo y un fondo de agar ácido de color amarillo con formación de gas y sulfuro de hidrógeno. Cuando se aísla *Salmonella* lactosa positiva, la superficie inclinada es de color amarillo.

La batería de pruebas API®20E es un sistema que permite la identificación de enterobacterias y otras bacterias gramnegativas rápidamente. La tira de pruebas contiene 20 microtubos con diferentes sustratos deshidratados, cada uno de los cuales corresponde a un tipo de prueba bioquímica distinta. Estos microtubos se rellenan de agua o de una disolución de cloruro sódico y se incuban a 36 ± 2 °C durante 18-24 h. Después de ser incubados, se realiza la lectura de las reacciones mediante la comparación con una tabla, donde se indica el resultado de la identificación en función del color aparecido en cada microtubo (Biomérieux, 2022).

7. Protocolo de aislamiento e identificación de *Listeria*

7.1 Análisis de las muestras

La determinación de *Listeria* se realizó según especifica la norma UNE-EN ISO 11290-1:2018 "Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp." El procedimiento se adaptó a la disponibilidad de las muestras con un enriquecimiento primario, un enriquecimiento secundario, la siembra en medios sólidos selectivos y la confirmación de las colonias sospechosas.

Enriquecimiento primario

Se pesó en condiciones de asepsia 1 gramo de la muestra en tubos con 9 mL de caldo Fraser (Scharlau, ref. 02-496-500) a media concentración suplementado con “*Listeria* Half Fraser Selective Supplement” (Scharlau, ref. 06-145LYO1). Tras homogeneizar las muestras se incubaron a 30 ± 1 °C durante 24-26 h.

En las **Tabla 11** se detalla la composición del caldo Fraser y del suplemento que se le añade:

Tabla 11. Composición del caldo Fraser.

Componente	Fórmula en g/L
Peptona de carne	5,00
Triptona	5,00
Extracto de carne	5,00
Extracto de levadura	5,00
Cloruro sódico	20,00
Esculina	1,00
Fosfato disódico (Anhi.)	9,60
Fosfato monopotásico	1,35
Cloruro de litio	3,00
<i>Listeria</i> Half Fraser Selective Supplement:	0,5234
Ácido nalidíxico	10 mg
Acriflavina	12,4 mg
Citrato férrico amónico	501 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, $7,2 \pm 0,2$	

Enriquecimiento secundario

En el enriquecimiento secundario se emplearon tubos de caldo Fraser a concentración completa.

Se inculó en cada uno de los tubos 1 mL del enriquecimiento primario y se incubó a una temperatura de 37 ± 1 °C durante 24 ± 2 h.

Aislamiento

Para el aislamiento de *Listeria* se sembraron dos medios de agar selectivo. La siembra en placa, según la norma indica, se realizó en Agar de *Listeria* conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA) (Oxoid, ref. CM1084) suplementado con “Ocla Selective Supplement” (Oxoid, ref. SR0226). El segundo de los medios complementario escogido por el laboratorio fue PALCAM (Scharlau, ref. 01-470-500) suplementado con “Palcam Selective Supplement” (Scharlau, ref. 06-110LYO1). Las placas se incubaron a 37 ± 1 °C durante 48 ± 2 h.

En las **Tablas 12 y 13** se detalla la composición de los medios ALOA y PALCAM y de sus suplementos:

Tabla 12. Composición del medio Agar de Listeria conforme a Ottaviani y Agosti (ALOA).

Componente	Fórmula en g/L
Digerido enzimático de tejidos animales	18,00
Digerido enzimático de caseína	6,00
Piruvato de sodio	2,00
Glucosa	2,00
Glicerofosfato de magnesio	1,00
Sulfato de magnesio (anhidro)	0,50
Cloruro de sodio	5,00
Extracto de levadura	10,00
Cloruro de litio	10,00
Fosfato de hidrógeno disódico (anhidro)	2,50
Mezcla cromogénica de X-glucósido	0,05
Agar	12,00
Ocla Selective Supplement: Ácido nalidíxico	20 mg
Polimixina B	76,7 UI
Ceftazimida	20 mg
Anfotericina	10 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 7,2 ± 0,2	

Tabla 13. Composición del medio PALCAM.

Componente	Fórmula en g/L
Triptona	23,00
Cloruro de litio	15,00
Manitol	10,00
Cloruro sódico	5,00
Extracto de levadura	3,00
Almidón	1,00
Esculina	0,80
Citrato férrico amónico	0,50
Dextrosa	0,50
Rojo fenol	0,08
Agar	13,00
Palcam Selective Supplement: Acriflavina	0,035
Polimixina B sulfato	2,5 mg
Cefataxima sódica	5 mg
Agua	10 mg
Agua	1000 mL
pH final a 25 °C, 7,2 ± 0,2	

En el agar ALOA las colonias típicas de *Listeria monocytogenes* son verde-azuladas rodeadas de un halo opaco. En el agar PALCAM aparecen colonias pequeñas, de color verde con reflejos grises y un centro negro que presenta depresión y rodeadas por un halo negro.

Confirmación

Se seleccionan 5 de las colonias sospechosas aisladas en cada medio sólido selectivo para identificarlas mediante la tira API® para *Listeria*.

Se siembran previamente en agar Columbia (Scharlau, ref. 01-034-500), suplementadas con 5 % agar sangre de caballo, el cual permite la observación de la beta-hemólisis tras su incubación a 37 ± 1 °C durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Los microorganismos que presenten capacidad hemolítica serán sometidos a las pruebas de oxidasa y catalasa. Aquellos casos en los que aparezca beta-hemólisis, oxidasa negativa y catalasa positiva, se les realizará la tira de pruebas API® para *Listeria*.

La prueba API® para *Listeria* es un sistema que permite la identificación rápida de bacilos gramnegativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias. La tira de pruebas contiene 10 microtubos con diferentes sustratos deshidratados. Se selecciona una colonia bien aislada y se resuspende en una ampolla API® Suspensión Medium de 2 mL hasta obtener una turbidez igual a 1 en la escala de MacFarland, se llenan los tubos y se incuban a $36 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ durante 18-24 h, en una atmósfera húmeda. Después de ser incubados, se realiza la lectura de las reacciones mediante la comparación con una tabla, donde se indica el resultado de la identificación en función del color aparecido en cada microtubo (Biomérieux, 2022).

8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurión, a través del ANOVA simple a partir del cual existen relaciones estadísticamente significativas entre los datos con un p-valor $< 0,05$, al 95 % de nivel de confianza y que no existan diferencias estadísticamente significativas con un p-valor $> 0,05$, al 95 % de nivel de confianza.

Se utilizó el diagrama de cajas y bigotes para observar la variabilidad entre los conjuntos de datos obtenidos en las diferentes pruebas. La “caja” comprende el 50 % de los valores centrales de los datos, extendiéndose por el primer y tercer cuartil. La línea central corresponde a la mediana. Los “bigotes” se extienden desde el menor al mayor de los valores observados y considerados “normales”. Aquellos valores que difieren del cuartil más cercano en más de 1,5 veces el intervalo intercuartílico se representan como puntos aislados y se consideran datos anómalos (Romero y Zúnica, 1993). En la **Figura 4** se puede observar un ejemplo del diagrama “Box-Whisker”.

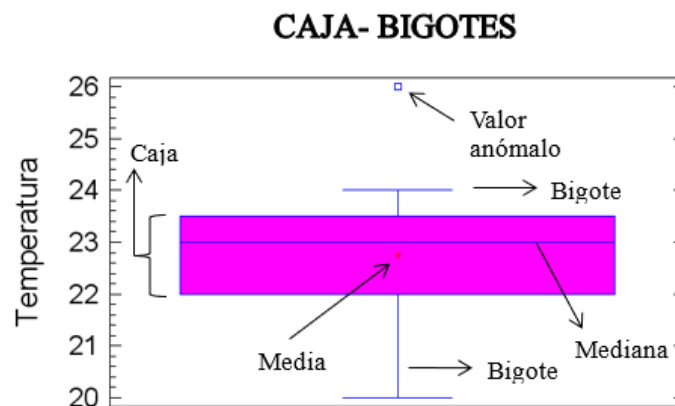


Figura 4. Ejemplo de diagrama Box-Whisker. Fuente: Romero y Zúnica, 1993.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros analizados nos permiten asegurar que se cumplen los criterios microbiológicos exigidos actualmente en España para poder consumir estas muestras de miel. Esta normativa en vigor es el Reglamento CE 2073/2005 modificado por el Reglamento CE 1441/2007 que establecen que la población máxima de *Listeria* spp. no debe ser superior a 10^2 UFC/g en alimentos listos para el consumo, durante su vida útil.

La Orden 5/8/83 (B.O.E 13/8/83) exigía más parámetros a controlar como el recuento de aerobios mesófilos con un máximo permitido de 10^4 UFC/g, mohos con un máximo de 10^2 UFC/g, y ausencia de *Salmonella*. Si esos parámetros se hubieran mantenido en la legislación actual, también se podría asegurar el cumplimiento de los criterios microbiológicos para el consumo de estas muestras miel.

Los datos de a_w y HR han sido cedidos por el LABMIEL de la UPV.

Tomando como valor máximo la a_w recomendada por Early (1996) de 0,56 que es la más restrictiva de los datos encontrados en la bibliografía, todas las muestras superan este valor y, por lo tanto, tienen elevada posibilidad de proliferación microbiana indeseada.

La HR recomendada en el RD 1049/2003 no debe superar el 20 % para la miel. En estas muestras, sin embargo, no se cumple esta recomendación para el 46,43 % (13/28).

En la **Tabla 14** se detallan los resultados obtenidos de cada muestra.

Tabla 14. Características de las muestras de miel estudiadas.

Región	Muestra	Disponibilidad de agua (a_w)	Humedad Relativa (HR)	Aerobios mesófilos (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	Aerobios esporulados (UFC/g)	Anaerobios sulfito-reductores
Nampula	I-21220 (1)	0,6321	20,2	$8,9 \times 10^2$	9×10^1	$1,67 \times 10^4$	+
	I-21230 (5)	0,6171	19,1	$9,3 \times 10^2$	2×10^1	2×10^2	-
	I-21223 (11)	0,618	19,2	$1,3 \times 10^3$	5×10^1	6×10^2	-
	I-21217 (15)	0,6262	19,9	8×10^2	4×10^1	1×10^2	-
	I-21224 (17)	0,6153	19,3	2×10^3	6×10^1	4×10^2	-
	I-21215 (21)	0,6171	19,3	$1,38 \times 10^3$	1×10^2	4×10^2	+
	I-21216 (22)	0,6208	19,3	$1,19 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	6×10^2	+

Región	Muestra	Disponibilidad de agua (a_w)	Humedad Relativa (HR)	Aerobios mesófilos (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	Aerobios esporulados (UFC/g)	Anaerobios sulfito-reductores
Sofala	I-21210 (2)	0,6332	20,7	$3,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^1$	0	-
	I-21206 (7)	0,6341	20,7	$3,7 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	0	-
	I-21201 (12)	0,6013	17,3	6×10^1	1×10^1	0	-
	I-21211 (13)	0,6041	20,5	$1,8 \times 10^2$	4×10^1	1×10^2	-
	I-21203 (19)	0,6023	17,5	$6,94 \times 10^2$	2×10^1	0	+
	I-21207 (23)	0,632	20,5	$1,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	1×10^2	+
	I-21208 (28)	0,5811	20,5	$1,7 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	4×10^2	-
Zambezia	I-21190 (3)	0,7243	24,5	$1,2 \times 10^3$	1×10^1	$4,5 \times 10^2$	-
	I-21192 (6)	0,6957	24,5	$6,8 \times 10^2$	1×10^1	2×10^2	-
	I-21182 (9)	0,7029	22,5	$1,9 \times 10^2$	3×10^2	0	-
	I-21198 (14)	0,6603	22,3	$9,1 \times 10^2$	5×10^2	2×10^2	-
	I-21185 (18)	0,6173	20,9	8×10^1	$1,2 \times 10^2$	0	-
	I-21187 (24)	0,706	24,6	$1,64 \times 10^3$	$2,91 \times 10^3$	8×10^2	-
	I-21188 (25)	0,7043	24,7	$1,8 \times 10^3$	2×10^1	4×10^2	-
Manica	I-21176 (4)	0,6434	15,1	$3,8 \times 10^2$	4×10^1	0	-
	I-21180 (8)	0,6007	18,5	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	6×10^2	-
	I-21170 (10)	0,6049	18,1	4×10^2	$1,6 \times 10^3$	4×10^2	-
	I-21175 (16)	0,6078	17,7	5×10^2	4×10^1	2×10^2	-
	I-21179 (20)	0,6054	18,5	$2,04 \times 10^3$	$1,82 \times 10^3$	3×10^2	-
	I-21172 (26)	0,5876	17,1	5×10^2	$3,4 \times 10^2$	1×10^2	+
	I-21174 (27)	0,5945	17,3	$2,2 \times 10^2$	6×10^1	0	-

1. Recuento de aerobios mesófilos

Los resultados obtenidos indican que la muestra 20 es la que mayor población de aerobios mesófilos contiene, que, con un total de $2,04 \times 10^3$ UFC/g no sobrepasa los límites establecidos por la orden de 1983 de 10^4 UFC/g que es el único límite encontrado en la bibliografía para este parámetro, y las muestras con menor población son la 12 y la 18 con 6×10^1 y 8×10^1 UFC/g respectivamente.

En la **Figura 5** se observa el recuento de la muestra 3.

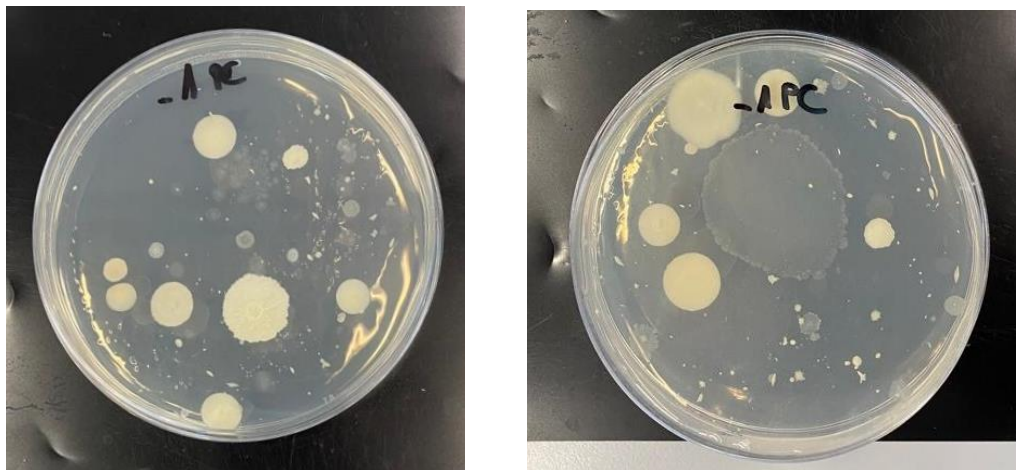


Figura 5. Muestra 3. Colonias de aerobios mesófilos en Plate Count Agar (PCA).

2. Recuento de mohos y levaduras

Los resultados obtenidos indican que la muestra 24 es la de mayor población de mohos y levaduras con un total de $2,91 \times 10^3$ UFC/g y, además, el 46,43 % (13/28) de las muestras analizadas excede los límites establecidos por la orden de 1983 de 10^2 UFC/g, que es el único límite encontrado en la bibliografía para este parámetro, y las muestras con menor población son la 3, 6 y 12 con 1×10^1 UFC/g.

Cuando los valores de humedad aumentan, se pueden producir fermentaciones y si observamos los resultados de los parámetros de la muestra 24 vemos que su HR es uno de los valores más elevados. En la legislación española actual no se establece ningún valor para este parámetro, aunque, por las alteraciones en la calidad de la miel que puede producir, debería contemplarse.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Sanz y col. (1995), donde solamente el 25 % de las muestras superaban el valor de 10^2 UFC/g, o con los estudios de Estupiñán (1998), con recuentos de mohos de 1 UFC/g, observamos una peor calidad microbiológica de nuestras muestras, lo que supone una mayor probabilidad de que sufran fermentaciones indeseadas.

En la **Figura 6** se observa el recuento de la muestra 20.



Figura 6. Muestra 20. Colonias de mohos y levaduras en Sabouraud Dextrose Agar con Cloranfenicol (SDA-C).

3. Recuento de aerobios esporulados

Los resultados obtenidos indican que la muestra 1 es la de mayor población de aerobios esporulados con un total de $1,67 \times 10^4$ UFC/g. Si observamos los resultados de esta muestra, vemos que los valores obtenidos de aerobios esporulados son mayores a los obtenidos en aerobios mesófilos ($8,9 \times 10^2$ UFC/g) y, en general, no se observa relación entre los dos parámetros indicadores en ninguna muestra.

La presencia de aerobios esporulados supone una mayor probabilidad de que aparezcan alteraciones indeseadas si las condiciones del alimento son favorables para la germinación, por lo que recomendamos establecer límites para el recuento de estos microorganismos.

En la **Figura 7** se observa el recuento de las muestras 3 y 24:

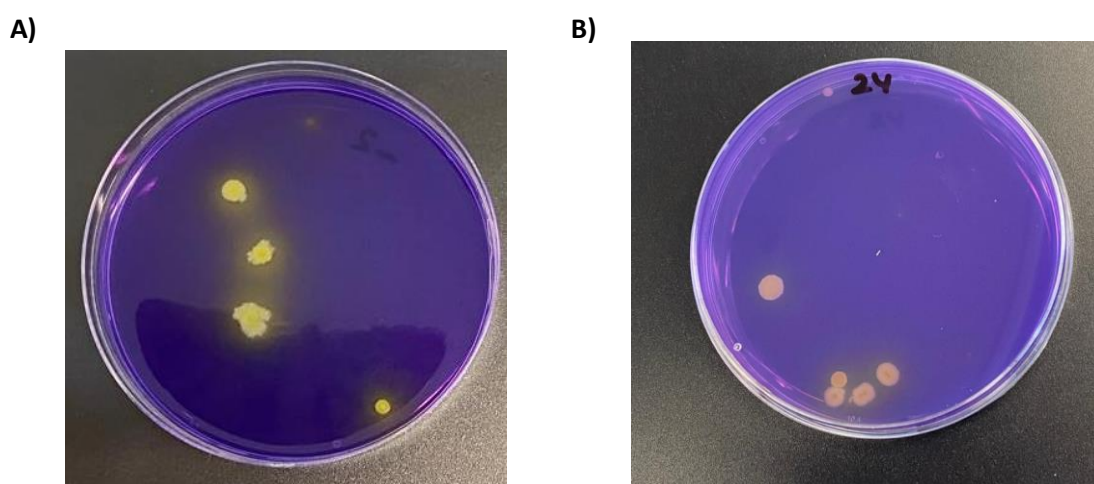


Figura 7. A) Muestra 3 y B) Muestra 24. Colonias de esporulados en Triptófano Desaminasa Agar (TDA).

4. Recuento de anaerobios sulfito-reductores

Se han detectado anaerobios sulfito-reductores en el 21,43 % de las muestras (6/28), en tres de las provincias: tres en Nampula, dos en Sofala y una en Manica. Debido al rápido crecimiento en los tubos, no se han podido contabilizar las colonias (**Figura 8**).

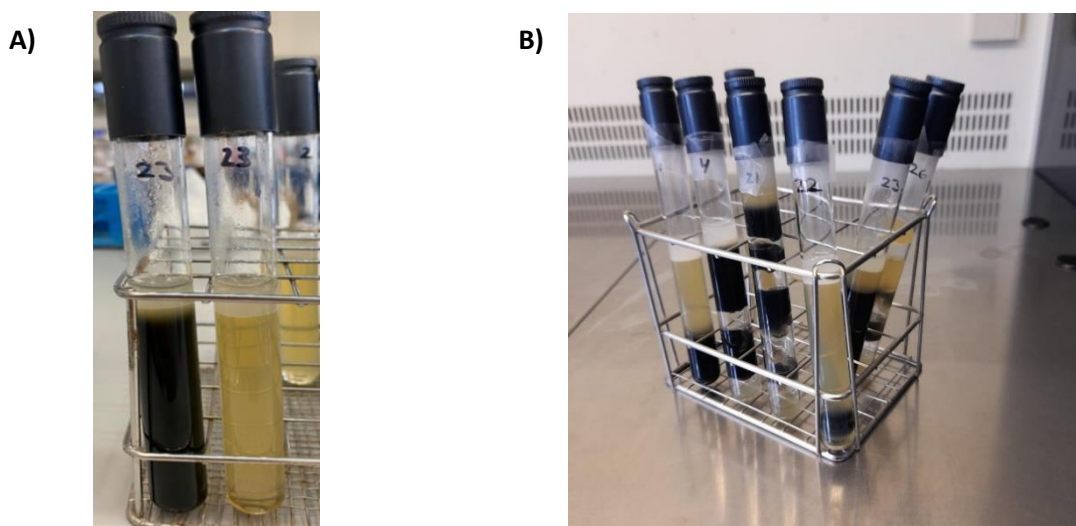


Figura 8. A) Muestra 23 y B) Total de muestras positivas. Sulfito-reductores en agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS).

Otros autores como Londoño y col. (2015) sí que obtuvieron 2,08 log UFC/g en muestras de miel.

Los anaerobios sulfito-reductores son un indicador de contaminación en alimentos cuando las condiciones de higiene durante su manipulación han sido deficientes (Gesche, 2003). En la legislación española actual no se establece ningún valor para este parámetro, aunque, por la posible presencia de clostridios causantes de problemas en niños y personas inmunodeprimidas, debería contemplarse y establecer ausencia de este grupo de microorganismos en miel.

5. Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. por métodos culturales

No se obtuvieron colonias sospechosas en los distintos medios de cultivo utilizados: el XLD y el agar cromógeno de *Salmonella*. Estos resultados difieren de otros estudios como el de Akpabli-Tsigbe (2015) donde se ha demostrado que se detectaron especies de *Salmonella* en el 19 % de las muestras de miel artesanal.

La ausencia de *Salmonella* confirma los datos de Coll y col. (2018) que describen la miel como un producto microbiológicamente estable. Por ello, aunque los resultados indiquen que las muestras de miel no son una fuente de *Salmonella*, puede haber ocurrido que la baja concentración de los microorganismos no se haya podido detectar mediante los métodos culturales.

6. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* por métodos culturales

No se obtuvieron colonias sospechosas en los medios de cultivo utilizados: el ALOA y PALCAM. Los resultados obtenidos coinciden con el estudio de Bakirdere (2018), que tampoco encontraron presencia de *Listeria* en ninguna de las muestras de miel analizadas.

La ausencia de *Listeria* confirma los datos de Coll y col. (2018) que describen la miel como un producto microbiológicamente estable. Aunque los resultados indiquen que las muestras de miel no son una fuente de *Listeria*, puede haber ocurrido que la baja concentración de los microorganismos no se haya podido detectar mediante los métodos culturales.

7. Análisis estadístico de resultados de los parámetros por provincias

En la **Tabla 15** se recogen los valores promedio de los parámetros a_w , HR, aerobios mesófilos, mohos y levaduras y aerobios esporulados, obtenida de las siete muestras de cada provincia, así como la desviación estándar y los valores mínimos y máximos. La tabla también muestra los resultados del ANOVA, el cociente F y las diferencias significativas de dichos parámetros entre provincias.

Tabla 15. Valores medios (y desviación estándar), mínimos y máximos de los parámetros disponibilidad de agua (a_w) Humedad Relativa (HR), aerobios mesófilos, mohos y levaduras y aerobios esporulados, de las muestras de miel de diferentes provincias de Mozambique.

PARÁMETROS	MANICA		SOFALA		NAMPULA		ZAMBEZIA		ANOVA Factor provincia
	Media (SD)	Mín/Máx	Media (SD)	Mín/Máx	Media (SD)	Mín/Máx	Media (SD)	Mín/Máx	
Disponibilidad de agua (a_w)	0,61 ^a (0,02)	0,59/0,64	0,61 ^a (0,01)	0,58/0,63	0,62 ^a (0,02)	0,61/0,63	0,69 ^b (0,04)	0,62/0,72	18,66***
Humedad Relativa (HR) (%)	17,47 ^a (1,18)	15,10/18,50	19,47 ^b (0,41)	19,10/20,20	19,67 ^b (1,56)	17,30/20,70	23,43 ^c (1,51)	20,90/24,70	27,54***
Aerobios mesófilos (log UFC/g)	2,76 ^a (0,33)	2,34/3,31	2,34 ^b (0,33)	1,78/2,83	3,06 ^b (0,14)	2,90/3,30	2,79 ^b (0,51)	1,90/3,25	4,98**
Mohos y levaduras (log UFC/g)	2,44 ^a (0,77)	1,60/3,26	1,71 ^a (0,63)	1,00/2,59	1,86 ^a (0,43)	1,30/2,66	2,00 ^a (0,94)	1,00/3,46	ns
Aerobios esporulados (log UFC/g)	2,02 ^a (0,74)	1,00/2,78	1,51 ^{a,b} (0,67)	1,00/2,60	2,75 ^{a,b} (0,70)	2,00/4,22	2,11 ^b (0,79)	1,00/2,90	3,44*

Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95 % obtenido por el estudio LSD. ns: no significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Los datos relacionados con la a_w dan como resultado que el 100 % de las muestras son superiores a 0,56, valor más restrictivo encontrado en la bibliografía. Se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las regiones con un valor de F de 18,66 diferenciándose dos grupos: Zambezia con un valor mayor de a_w (0,68) frente a Nampula (0,62), Manica (0,61) y Sofala (0,61). Esto se debe a que cada una de las muestras de miel procedentes de Zambezia presenta una a_w bastante superior a las de las demás regiones, como se aprecia en el gráfico de cajas y bigotes (**Figura 9**).

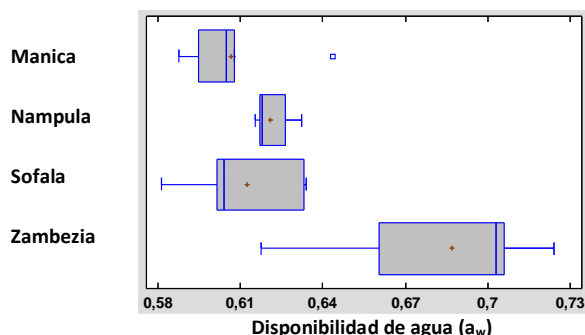


Figura 9. Análisis comparativo entre los valores de disponibilidad de agua (a_w) y las diferentes provincias.

Respecto a la HR, el 46,43 % (13/28) de las muestras son superiores al valor recomendado por el RD 1049/2003 del 20 % (BOE, 2003). Se observa una diferencia estadísticamente significativa con un valor de F de 27,54. Como ocurre con la a_w , se diferencian dos grupos de provincias. Por un lado, Zambezia con el valor más alto de HR (23,43 %) y por el otro, Sofala (19,67 %), Nampula (18,47 %) y Manica (17,47 %). De nuevo, como se observa en el gráfico de cajas y bigotes (**Figura 10**), los datos de HR en Zambezia son superiores a las demás regiones.

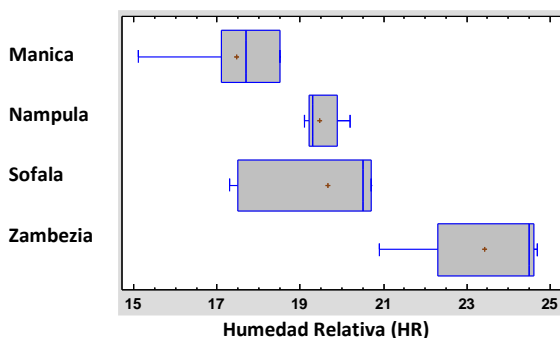


Figura 10. Análisis comparativo entre los valores de Humedad Relativa (HR) y las diferentes provincias.

La Orden 5/8/83 del BOE 13/8/83 establecía que el valor límite para el recuento de aerobios mesófilos no debía superar 10^4 UFC/g (Moragas y Valcarcel, 2021) y del total de las muestras ninguna supera 4 log UFC/g. Nampula es la provincia con mayor recuento de aerobios mesófilos (3,06 log UFC/g) seguida de Zambezia (2,79 log UFC/g) y Manica (2,76 log UFC/g) en comparación a Sofala (2,34 log UFC/g), la cual es diferente estadísticamente respecto de las otras provincias. En la **Figura 11** se observa que los datos referentes a Nampula se encuentran en la parte derecha del gráfico ya que todas las muestras pertenecientes a esta provincia presentan recuentos superiores.

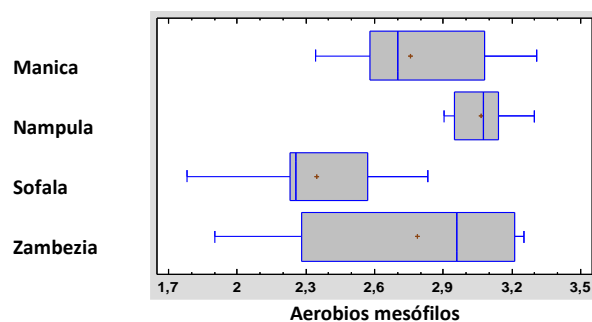


Figura 11. Análisis comparativo entre los recuentos de aerobios mesófilos (log UFC/g) y las diferentes provincias.

El límite para el recuento de mohos y levaduras establecido por la Orden 5/8/83 del BOE 13/8/83 no debía superar 10^2 UFC/g (Moragas y Valcarcel, 2021) y del total de las muestras, el 46,43 % (13/28) fueron valores superiores a 2 log UFC/g. Se observa que Manica es la que mayor recuento obtiene en mohos y levaduras (2,44 log UFC/g) frente a Zambezia (2,00 log UFC/g), Nampula (1,86 log UFC/g) y Sofala (1,71 log UFC/g). Aun así, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro provincias. Los parámetros de a_w y HR suelen estar relacionados con el crecimiento y desarrollo de mohos y levaduras, como es el caso de Zambezia, provincia con datos más elevados de estos dos parámetros. Cabe destacar que la provincia de Manica es la que tiene menores valores de a_w y HR y, sin embargo, es la que desarrolla más crecimiento.

En cuanto a los aerobios esporulados, se observa una diferencia estadísticamente significativa con un valor de F de 3,44 especialmente entre las provincias de Nampula (2,75 log UFC/g) y Sofala (1,51 log UFC/g). En el gráfico de cajas y bigotes (**Figura 12**) se puede observar esta diferencia entre regiones.

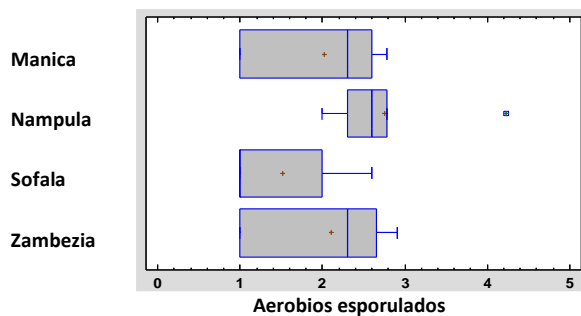


Figura 12. Análisis comparativo entre los recuentos de aerobios esporulados (log UFC/g) y las diferentes provincias.

V. CONCLUSIONES

1. El criterio microbiológico que define la aceptabilidad de la miel en España debería ser revisado para evitar proliferación de microorganismos contaminantes y la disponibilidad de agua debería limitarse para impedir este crecimiento. De esta forma, se cumpliría con el Objetivo 1 para la Salud y Bienestar dentro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS-ONU) .
2. Zambezia es la provincia con valores de disponibilidad de agua (a_w) y Humedad Relativa (HR) significativamente mayores que el resto, pero no se han podido establecer relaciones con los otros parámetros.
3. Se ha detectado la presencia de anaerobios sulfito-reductores en tres provincias (Nampula, Sofala y Manica) pero no se ha podido establecer ninguna relación con el resto de parámetros.
4. No se ha aislado *Salmonella spp.* ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas
5. Los resultados del ANOVA mostraron que las mieles de las cuatro regiones difieren significativamente respecto a la a_w , HR, aerobios mesófilos y aerobios esporulados, pero no existen diferencias en cuanto a la población de mohos y levaduras.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AESAN (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el botulismo infantil. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_ri_esgos/informes_comite/BOTULISMO_INFANTIL.pdf Visto el 22 de mayo de 2022.

AESAN (2012). Directrices para el muestreo oficial de líneas de producción de alimentos listos para el consumo que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y actuaciones consiguientes. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/interpretacion_es/biologicas/listeria_anexo.pdf Visto el 11 de junio de 2022.

AESAN (2019). Documento de orientación para la verificación de estudios de vida útil en relación con *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Verificacion_vida_util.pdf Visto el 5 de junio de 2022.

AESAN (2022). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Salmonelosis. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm Visto el 5 de junio de 2022.

AESAN (2022). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Contaminantes. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/contaminantes.htm Visto el 20 de mayo de 2022.

Akpabli-Tsigbe, NDK (2015). Quality evaluation of artisanally produced honey sold on ghanaiian markets. <http://ugspace.ug.edu.gh/bitstream/handle/123456789/8731/Quality%20Evaluation%20of%200Artisanally%20Produced%20Honey%20Sold%20on%20Ghanaian%20Markets%20-%202015.pdf?sequence=1> Visto el 15 de junio de 2022.

ANMAT (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf Visto el 11 de junio de 2022.

Bakirdere S; Yaroglu T; Tirik N; Demiroz M; Karaca, A (2018). Analysis of some physical, chemical and microbiological aspects of honey samples produced and consumed in Turkey. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 50(1), 263-271 pp. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652018000100018&lng=es&tlng=en

Belitz, HD; Grosch, W (1997). Química de los alimentos. 2ª Ed. Acribia S.A. Zaragoza. 152-173; 923-955 pp.

Biomérieux (2022). Tira API para *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. <https://www.biomerieux.es/> Visto el 2 de junio de 2022.

BOE (2003). Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la miel. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2003/08/01/1049/dof/spa/pdf> Visto el 21 de junio de 2022.

BOE (2015). Real Decreto 473/2015, de 12 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la miel. <https://www.boe.es/boe/dias/2015/06/20/pdfs/BOE-A-2015-6841.pdf> Visto el 21 de junio de 2022.

Climate-Data (2022). Datos climáticos mundiales. Clima: Mozambique. <https://es.climate-data.org/africa/mozambique-88/> Visto el 18 de junio de 2022.

Codex Alimentarius (2019). Norma para la miel. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf Visto el 17 de mayo de 2022.

Coll, F; Villat, C; Laporte, G; Noia, M; Mestorino, N (2018). Características microbiológicas de la miel. Revisión bibliográfica. https://www.researchgate.net/profile/Nora-Mestorino/publication/275584391_Caracteristicas_microbiologicas_de_la_miel/links/554034620cf2736761c27459/Caracteristicas-microbiologicas-de-la-miel.pdf Visto el 5 de junio de 2022.

COMIECO (2022). Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:17 “Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos”. <ANEXO-RES-402-2018-RTCA-Criterios-Microbiologicos-Version-Final-19-06-2018.pdf> (inida.org) Visto el 17 de junio de 2022.

Datosmacro (2022). Mozambique: Economía y demografía. <https://datosmacro.expansion.com/paises/mozambique> Visto el 18 de junio de 2022.

ELIKA (2021). Fundación vasca para la Seguridad Agroalimentaria. <https://www.elika.eus/es/> Visto el 5 de junio de 2022

Estupiñán, S (1998). Estudio para la caracterización de mieles artesanales de Gran Canaria. Tesis doctoral.

EUR-Lex (2005). Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20180101&from=EN> Visto el 21 de junio de 2022.

EUR-Lex (2007). Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&from=ES> Visto el 21 de junio de 2022.

FAO (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Miel. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA4657ES/> Visto el 16 de mayo de 2022.

FAO (2022). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Conceptos básicos. <https://www.fao.org/in-action/pesa-centroamerica/temas/conceptos-basicos/es/> Visto el 20 de mayo de 2022.

FAOSTAT (2020). Cultivos y productos de ganadería. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize> Visto el 21 de junio de 2022.

Ferrer, P; Morales, M (2005). Determinación de la calidad microbiológica de la miel. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19309/1/FV-26472.pdf> Visto el 23 de mayo de 2022.

Gesche, E; Vallejos, A; Saez, M (2003). Efficiency of Sulphite-reducing bacteria as sanitary-indicator for water. MPN-Method. Archivos de medicina veterinaria, 35(1), 99-107 pp. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2003000100011>

InfoAgro (2022). Microorganismos productores de alteraciones en los alimentos enlatados (1ª parte). <https://www.infoagro.com/conservas/microorganismos.htm> Visto el 20 de junio de 2022.

ISO 7937: 2004. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica del recuento de colonias.

ISO 7218: 2008. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

ISO 4833-1: 2013. Microbiología de la cadena alimentaria: método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 2: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de recubrimiento superficial.

ISO 14189: 2013. Calidad del agua. Recuento de *Clostridium perfringens*. Método de filtración en membrana.

ISO 6579-1: 2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de la *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.

ISO 11290-1: 2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección.

ISO 8199: 2018. Calidad del agua. Requisitos y orientaciones generales para el examen de microorganismos mediante cultivo.

Londoño, CH; Ascencio, DJ; Correa, AR; Cecilia, M (2015). Evaluación de la calidad microbiológica de miel de *Tetragonisca angustula* durante el almacenamiento. http://extension.palmira.unal.edu.co/fileadmin/recursos/direcciones/investigacion_bogota/documentos/enid/2015/memorias2015/ingenieria_tecnologias/evaluacion_de_la_calidad_microbiologica_de_.pdf Visto el 20 de junio de 2022.

López, L; Berriel, R; González, G; García, JA; Rodríguez de Castro, F (2017). Proyecto ULPGC-UniZambeze. Formación médica universitaria en países en desarrollo. FEM: Revista de la Fundación Educación Médica, 20(3), 111-116 pp. <https://dx.doi.org/10.33588/fem.203.888>

Manzo, CA (2012). Las abejas nativas sin aguijón (Meliponini) en la Huasteca Potosina. [manual_meliponicultura.pdf \(weebly.com\)](manual_meliponicultura.pdf) Visto el 21 de junio de 2022.

Moragas, M; De Pablo, M.B (2003). Normas microbiológicas por alimentos <http://veterinaria.unex.es/sem/normicin.htm> . Visto el 2 de junio de 2022.

Moragas, M; Valcarcel, S (2021). Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/doc_seguridad_alimentaria/es_def/adjunto_s/control-alimentos/seguridad-microbiologica/normas-microbiologicas-alimentos-enero-2021.pdf Visto el 2 de junio de 2022.

Mossel, DAA; Moreno, B; Struijk, CB (2003). Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad). Acribia S.A. Zaragoza. 248-251 pp.

Naciones Unidas (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (2015). <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/> Visto el 30 de junio de 2022.

Obregón, DC; Zambrano, ZJ (2017). Evaluación microbiológica (aerobios mesófilos, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*) y químico - toxicológica de metales pesados (pb, hg) en leche para consumo humano en el distrito de Puente Piedra – Lima. <https://core.ac.uk/download/pdf/323341338.pdf> Visto el 17 de junio de 2022.

OMS (2022). Botulismo. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism> Visto el 21 de junio de 2022.

Oxoid (2022). Medios de cultivo deshidratados. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1007&c=UK&lang=EN Visto el 18 de mayo de 2022.

Palacio, D (2010). Resolución 1057 de 2010 por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que debe cumplir la miel de abejas para el consumo humano. <https://www.suin-juriscal.gov.co/viewDocument.asp?id=30033903> Visto el 20 de junio de 2022.

Periago, MJ (2022). Microorganismos marcadores: índices e indicadores. Significado y características. Aislación e identificación. <https://www.um.es/documents/4874468/10812050/tema-1.pdf/ec37d0dd-cb46-4498-9f54-8c38be0fd5b6> Visto el 11 de junio de 2022.

RENAVE (2022). Resultados de vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/ultimo%20informe.pdf> Visto el 27 de mayo de 2022.

Romero, R; Zúniga, L (1993). Estadística. Diseño de experimentos. Modelos de regresión. SPUPV 93.637. Valencia.

Sancho, J; Baldris, R; Sanchez, M (1989). Manual de medios de cultivo para microbiología. ADSA. Barcelona.

Sanz, S; Gradillas, G; Jimeno, F; Pérez, C; Juan, T (1995). Fermentation problem in Spanish North-Coast Honey. Journal of Food Protection. 515-518 pp.

Salamanca, G; Henao, CA; Moreno, GI; Luna, A (2000). Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/725-caracteristicas-microbiologicas-mieles-tropicales> Visto el 22 de mayo de 2022.

Sagua, T (2017). Actividad de agua (a_w) en alimentos. <http://laenciclopediagalactica.info/2017/11/28/actividad-de-agua-aw-en-alimentos/> Visto el 18 de junio de 2022.

Scharlau (2022). Productos. *C. perfringens* Agar Selectivo (SPS Agar). <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-050-500> Visto el 18 de mayo de 2022.

Scharlau (2022). Productos. XLD Agar (Eur. Pharm.). <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-211-500> Visto el 18 de mayo de 2022.

SEIMC (2022). Anaerobios. Documentos científicos. <https://seimc.org/documentos-cientificos/infecciones-por-microorganismo/bacteriologia/anaerobios> Visto el 21 de junio de 2022.

Talens, P (2022). Predicción del valor de actividad de agua de un alimento húmedo o de humedad intermedia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/68347/Talens%20Predicci%C3%B3n%20del%20valor%20de%20actividad%20de%20agua%20de%20un%20alimento%20h%C3%BAmedo%20o%20de%20humedad%20intermedia.pdf?sequence=1#:~:text=La%20actividad%20de%20agua%20es,estabilidad%20de%20los%20productos%20alimenticios> Visto el 18 de junio de 2022.

Tanlenque-Alberto, FJ; Escriche, I (2015). Análisis químico de mieles de Mozambique. https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/53414/TFM%20Tanleque%2017%20junio%20corregido%20entregar_14346163872565703574722995274096.pdf?sequence=1 Visto el 7 de junio de 2022.

Universitat Politècnica de Valencia (2000). *Análisis Microbiológico de los Alimentos y Control de los Procesos de Fabricación*. Editorial de la Univerisdad Politècnica de Valenica. Valencia.

Valega, O (2022). Los tres estados de la miel. <https://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/1178-tres-estados-miel-solida-cristalizada-liquida-cremada> Visto el 13 de junio de 2022.

Verde, M (2014). Apicultura y seguridad alimentaria. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193030122008.pdf> Visto el 20 de mayo de 2022.

Zandamela, EM (2008). Caracterización físico-química y evaluación sanitaria de la miel de Mozambique. <https://1library.co/document/6qmv5nwq-caracterizacion-fisico-quimica-evaluacion-sanitaria-miel-mozambique.html> Visto el 15 de mayo de 2022.