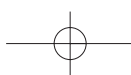
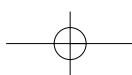
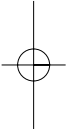
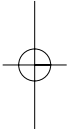
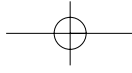
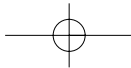


Volumen 22 (1997) 1999
Sección BIOLOGÍA MOLECULAR Y MICROBIANA, 5







FLORA MICROBIANA EN MIELES DE LA REGIÓN DE MURCIA, ESPAÑA

Pérez Sánchez M. C.; del Baño Breis F.; Candela Castillo M. E. y Egea Gilabet C.

Recibido: 2 noviembre 1994

Acceptado: 16 febrero 1996

SUMMARY

Microbial flora in honey from the Region of Murcia, Spain.

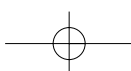
Eighteen honeys from the Region of Murcia, Spain, have been analysed microbiologically. No fermented or altered samples have been found but all contained fungal spores, most of which belonged to soil fungi although some parasitic fungi of insects and plants were also detected. The most common genus was *Aspergillus*, found in thirteen samples, followed by *Alternaria* in eleven samples, *Pullularia* in ten samples, *Penicillium* in seven samples and *Cladosporium* in five samples. On the other hand, yeasts were only detected in two samples, in both cases belonging to the genus *Candida*. Bacterial contamination was variable. No samples containing coliforms or *Salmonella* were found, although *Micrococcus roseus* and *Bacillus subtilis* were identified in many samples. These organisms are not harmful to consumers and may play an important role in the production of bee bread.

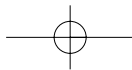
Key words: Honey, fungi, bacteria, yeasts.

RESUMEN

Se han analizado, desde el punto de vista microbiológico, dieciocho muestras de miel de la Región de Murcia (España), y en ninguna de ellas se encontraron mieles fermentadas o alteradas. Todas las muestras contienen esporas fúngicas, procedentes de hongos del suelo y también de hongos parásitos de insectos o de plantas. Los géneros más abundantes fueron: *Aspergillus*, presente en trece muestras, *Alternaria* en once, *Pullularia* en diez, *Penicillium* en siete y *Cladosporium* en cinco. Las levaduras, representadas por el género *Candida*, solamente se detectaron en dos muestras. El análisis bacteriano fue cualitativo y cuantitativo. Once muestras dieron positivo para anaerobias termófilas. En medio PCA se identificaron *Micrococcus roseus* y *Bacillus subtilis* que no producen alteraciones e, incluso, pueden ser importantes en la elaboración del pan de abejas. En ninguna muestra de miel se encontraron coliformes o *Salmonella*.

Palabras clave: Miel, hongos, bacterias, levaduras.





INTRODUCCIÓN

Las características organolépticas y sanitarias de una miel pueden estar determinadas por la influencia de factores físicos, químicos y microbiológicos. Entre estos últimos, los hongos, levaduras y bacterias presentes en la miel, pueden llegar a ésta durante su elaboración por las abejas, el procesado, o el envasado.

Las primeras investigaciones micológicas en mieles, ya reconocieron que ciertos hongos son frecuentemente saprófitos y se encuentran en las abejas melíferas, sus crías y el polen fresco. BETTS (1912) encontró *Cladosporium* y *Mucor erectus* en el polen contenido en los cestillos de las abejas, y *Bettsia alvei*, *Eremascus fertilis*, *Gymnoascus setocus*, *Oospora favorum* y *Penicillium crustaceum* en el polen almacenado en la colmena. No obstante, esta autora señaló que la miel parecía ser inmune al ataque de los hongos. FARRIS *et al.* (1981) analizaron cuarenta y nueve muestras de miel de Cerdeña y consideraron de suma importancia los controles microbiológico, químico y físico, recomendando que éstos sean considerados imprescindibles para certificar mieles destinadas al consumo humano.

KLUNGUESS y PENG (1983) examinaron bolas de polen con microscopía electrónica de barrido, y no encontraron deterioradas las paredes de los granos, por lo que dedujeron que la miel y el néctar empleados por la abejas para configurar las bolas actuaban como conservantes del polen.

GILLIAN *et al.* (1989) hallaron en sus muestras de miel más hongos que levaduras y bacterias. En general, la presencia de esporas e hifas fúngicas no altera la miel, aunque ciertos hongos, y sobre todo algunas levaduras y bacterias osmófilas pueden desnaturalizarla.

El propósito de este trabajo fue identificar y cuantificar la flora microbiana, constituida por hongos, levaduras y bacterias, en dieciocho muestras de miel de la Región de Murcia ya tipificadas por nosotros, (BAÑO *et al.* 1993), así

como estudiar su influencia en cada tipo de miel, valorar el estado sanitario y, en consecuencia, conocer el grado de salubridad que ofrecen al consumidor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de mieles fueron solicitadas por los autores a apicultores profesionales, semiprofesionales y aficionados de la Región de Murcia. Para cada una de ellas se cumplimentó un cuestionario con los datos facilitados por el apicultor, referentes al tipo de miel, fecha de la cosecha, origen geográfico y prácticas de trashumancia.

Preparación de las muestras

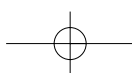
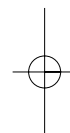
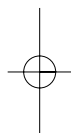
Se obtuvieron tres diluciones de cada muestra de miel, pesando en matraces aforados 40, 4 y 0,4 g de miel, y enrase hasta 100 ml con agua destilada estéril. Alícuotas de estas diluciones se utilizaron como inóculo en los distintos medios de cultivo para el aislamiento de hongos, levaduras y bacterias.

Examen de hongos filamentosos

Se sembraron 10 placas con 0,1 ml de la dilución más concentrada en cada uno de los siguientes medios: Agar con patata y dextrosa (Potato Dextrose Agar); Agar de Cooke con rosa de bengala (Cooke Rose Bengal Agar); Agar maltosado de Sabouraud (Sabouraud Maltose Agar); Agar con solución de Czapek (Czapek Solution Agar). Las placas fueron incubadas a 27°C, y las colonias desarrolladas, se aislaron en nuevas placas con el mismo medio, en las cuales se realizó el estudio macro y microscópico.

Para inhibir el crecimiento de bacterias, se añadió a los medios clorotetraciclina, a una concentración de 250 mg/l.

Los hongos se clasificaron siguiendo las claves de WEBSTER (1970), BARNETT &



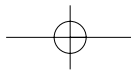
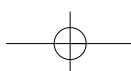
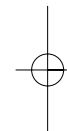
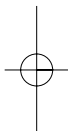
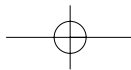


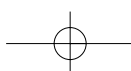
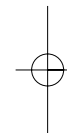
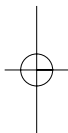
TABLA 1. Hongos y levaduras aislados en mieles de la Región de Murcia
Fungi and yeast isolated from honey from Region of Murcia.

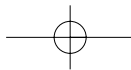
Nº	ORIGEN	ORIGEN GEOGRAFICO	GÉNEROS Y ESPECIES	
	BOTANICO		HONGOS	LEVADURAS
1	espliego	Aledo	<i>Cladosporium</i>	ausentes
2	limonero	Monteagudo	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>Pullularia</i>	ausentes
3	frutal	Ricote	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus terricola</i> <i>Pullularia</i> <i>Cladosporium</i>	ausentes
4	azahar	Murcia	<i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Rhizopus</i>	ausentes
5	tomillo	Ricote	<i>Stachylidium</i> <i>Periconia</i> <i>Penicillium virescens</i> <i>Penicillium duclauxi</i> <i>Lacellinopsis</i>	ausentes
6	albaida	Calasparra	<i>Pullularia</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Lacellinopsis</i>	ausentes
7	girasol	Calasparra	<i>Alternaria</i> <i>Pullularia</i> <i>Aspergillus luchuensis</i> <i>Penicillium subcinereum</i> <i>Penicillium citreo viride</i>	<i>Candida</i> sp
8	frutal	Calasparra	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Trichoderma</i> <i>Alternaria</i>	ausentes
9	frutal	Moratalla	<i>Alternaria</i> <i>Pullularia</i>	ausentes
10	limonero	Alquerias	<i>Monilochaetes</i> <i>Pullularia</i> <i>Alternaria tenuis</i> <i>Penicillium virescens</i> <i>Penicillium citreo viride</i> <i>Aspergillus luchuensis</i> <i>Sclerotium cepivorum</i>	ausentes
11	espliego	Moratalla	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus flavipes</i>	ausentes





Nº	ORIGEN	ORIGEN GEOGRAFICO	GÉNEROS Y ESPECIES	
	BOTANICO		HONGOS	LEVADURAS
12	frutal	Totana	<i>Aspergillus luchuensis</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>Penicillium szulczewskii</i> <i>Alternaria</i> <i>Rhizopus</i>	ausentes
13	azahar	Totana	<i>Aspergillus lutescens</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terricola</i> <i>Pullularia</i> <i>Alternaria</i> <i>Periconiella</i> <i>Rhizopus</i>	ausentes
14	albaida	Totana	<i>Stachybotrys</i> <i>Alternaria</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus penicilloides</i> <i>Dicoccum</i> <i>Penicillium virescens</i> <i>Ceratocystis</i> <i>Cladosporium</i> <i>Gonatobotryum</i> <i>Aspergillus lutescens</i>	<i>Candida</i> sp
15	romero	Totana	<i>Mammarian</i> <i>Alternaria</i> <i>Pullularia</i> <i>Ostrachoderma</i>	ausentes
16	espliego	Totana	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Penicillium rugulosum</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Pullularia</i> <i>Cladosporium</i> <i>Sclerotium cepivorum</i>	ausentes
17	azahar	Totana	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Pullularia</i> <i>Hyalodendrom</i>	ausentes
18	limonero	Ricote	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Oospora citri amanti</i> <i>Penicillium aurantium brunneum</i> <i>Penicillium subcinereum</i> <i>Sclerotium cepivorum</i>	ausentes





HUNTER (1972), y ALEXOPOULOS & MINS (1985).

Examen de levaduras

Para comprobar la formación de pseudomicelio, crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis, la asimilación y fermentación de azúcares, formación de esporas y pigmentación, se prepararon en tubos o placas los siguientes medios: Caldo para levaduras (YM Broth) y Extracto de levadura (Yeast Extract) al que se adicionó glucosa, sacarosa, lactosa y maltosa al 1%, o rafínosa al 2%. Los tubos se prepararon con campanas Durham y se incubaron a 23 y 27°C. Para facilitar la esporulación se utilizó el medio de Gorodkova, y el medio de Sabouraud para comprobar la aparición de colonias pigmentadas. Todos los medios fueron tratados con clorotetraciclina para inhibir el crecimiento de bacterias.

Las claves utilizadas fueron las de Barnett, PAYNE & YARROW (1983) y KLEGER-VAN RIJ (1984).

Examen de bacterias

Para detectar bacterias aerobias, se prepararon tres series de tres tubos con 10 ml de medio "Yeast Extrat" y glucosa al 2%. Fueron inoculados con 1 ml de cada una de las diluciones e incubados a 27°C. En las pruebas positivas se procedió al recuento utilizando el método del número más probable (NMP).

El cultivo de bacterias aerobias mesófilas se realizó mediante recuento en placa, en medio PCA (Plate-count agar), a 37°C.

Para la evaluación de anaerobias termófilas, se inocularon tres series de tres tubos, con Medio de carne cocida (Cooked meat medium), con las tres diluciones preparadas. Se cerraron los tubos con tapones vaspar (mezcla al 50% de vaselina y parafina fundidas), e incubaron a 50°C durante 48 horas.

La prueba selectiva, para detectar bacterias

coliformes, se realizó por la técnica de filtración en membrana (filtro Sartorius). Se filtraron 5 g de miel disueltos en 50 ml de agua destilada estéril, y se incubaron en placas con medio Endo a 37°C durante 24-48 horas. La prueba presuntiva de *Salmonella*, se hizo en tres matraces con 25 ml de Caldo selenito y cistina (Selenite Cystine Broth), inoculados con 2,5 ml de la dilución más concentrada, e incubados a 37°C durante 48 horas.

Para la técnica del NMP, se utilizaron las tablas de Jacobs y Gerstein's reproducidas por COLLINS & LYNES (1989).

Para la clasificación de las bacterias se utilizaron las claves de BERGEY'S (1984).

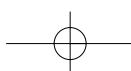
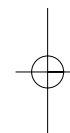
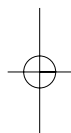
Los diversos medios de cultivo empleados en el presente trabajo, se prepararon con productos Difco.

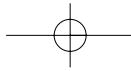
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hongos

La tabla 1 recoge los hongos filamentosos y levaduras, aislados de las dieciocho muestras de miel analizadas, así como su correspondencia con los orígenes botánico y geográfico de las respectivas mieles. Lo anterior pudiera servir para establecer una correlación entre los pólenes identificados por el espectro polínico, (Baño *et al* 1993), y los conidios de los hongos encontrados. En ningún caso hemos hallado mieles fermentadas o alteradas. Sin embargo, de todas las muestras hemos aislado hongos, gran parte de los cuales se desarrollan y viven en el suelo.

El análisis micológico puso de manifiesto la presencia de *Aspergillus parasiticus* en las muestras 17 y 18, patógeno de insectos. *Oospora citri amanti* hallado en la muestra 18, miel de limonero, se encuentra frecuentemente en *Citrus*. Algunos, como *Alternaria*, *Pullularia* y *Periconia*, también detectados en la mayoría de las muestras son parásitos de plantas superiores, y otros como *Cladosporium*, se





encuentran frecuentemente en el polen o son hongos del suelo donde viven saprofiticamente.

37 especies de hongos, pertenecientes a 22 géneros fueron encontrados en las 18 muestras de mieles estudiadas (Tabla 1). Los hongos del género *Aspergillus*, representado por diez especies, resultaron ser los que se presentaron más frecuentemente en las muestras ensayadas (72%), seguidos por *Alternaria*, (62%), *Pullularia*, (56%), *Penicillium*, siete especies (38%), *Cladosporium*, (28%), *Rhizopus* y *Sclerotium*, (17% cada uno) y *Lacellinosis*, (11%). El resto de los géneros, se encontraron en un número menor de muestras (6%).

De los 80 hongos aislados *Aspergillus* resultó ser el género más frecuentemente encontrado, 27%, seguido por, *Alternaria* y *Penicillium*, 14% cada uno, *Pullularia* 12,5 %, *Cladosporium* 6,25%, y *Sclerotium*, 4%. El resto de los géneros de hongos presentes en las muestras se hallaron en menor proporción, no alcanzando ninguno de ellos más del 2,5% del total de los géneros presentes en las mieles analizadas.

De las 18 muestras, diez son de *Citrus* (limonero y azahar) y frutal, (56%), y son consideradas como características de la Región de Murcia. Al comparar su origen botánico, con las frecuencias de los géneros de hongos más abundantes, se observó que *Alternaria*, (64%), *Aspergillus* (62%) y *Pullularia* (60%) se habían aislado en estas típicas mieles casi un 25% más que en el resto de las muestras.

FARRIS *et al.* (1985) estudiaron 52 muestras y solamente en 30 encontraron hongos, nosotros los hemos aislado de todas. Muchos de estos hongos, como demostraron GILLIAM & PREST (1972), son incorporados a la miel por el aparato digestivo de las abejas, no son simbióticos ni patógenos para ellas, y proceden de las plantas y suelos de las zonas donde pecorean.

Levaduras

Las levaduras en la miel han sido poco estu-

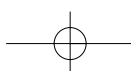
diadas. FURUKA & OKIMOTO (1975) analizaron doce muestras de distinto origen floral, y encontraron 99 cepas que agruparon en cinco géneros, todas ellas tolerantes a altas concentraciones de azúcar. Estos autores, utilizando como medio de cultivo extracto de levadura-extracto de malta-peptona-glucosa-agar, y el mismo con un 50% de glucosa, comprobaron que las levaduras crecían indistintamente en ambos medios. POCINI & WIMMER (1986), para favorecer el crecimiento de levaduras, supuestamente osmófilas, prepararon medios nutritivos con miel como única fuente de carbono, a concentraciones de 25, 50, 75, y 100%, dedujeron que al cabo de tres semanas se mantiene la curva de crecimiento a la concentración de 50% en cuyo momento identificaron las colonias. En cuatro, de las siete muestras estudiadas encontraron *Saccharomyces* y, en cinco, *Zygosaccharomyces*; *Torulopsis* en dos y *Schizosaccharomyces* en una.

GILLIAN (1979 a), observa que el número de cepas aisladas y especies encontradas decrece con el tiempo y el almacenamiento, y que la mayoría de las levaduras procedentes de polenes de flores y de los recogidos con cazapólenes, no se encuentran en el pan de abejas. Además tanto las levaduras aisladas del polen floral como las del recogido, fermentan más azúcares y asimilan más compuestos de carbono que las procedentes del pan de abeja.

Por nuestra parte, y a diferencia de los veintidos géneros de hongos encontrados, las levaduras solo fueron aisladas en las muestras 7 y 14, y están representadas por el género *Candida* sin capacidad fermentativa.

Bacterias

La tabla 2 recoge el resultado del análisis bacteriano. Según ella unas mieles carecen de carga bacteriana, en otras, la concentración es elevada, aunque no representativa cuando se trata de bacterias aerobias, donde se admite hasta 10000 por gramo. Solamente se han iden-



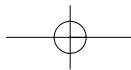
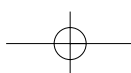
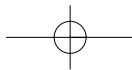


TABLA 2. Bacterias presentes en mieles de la Región de Murcia
Bacteria found in honeys from Region of Murcia.

Nº	Aerb.	Aerb.m.	An.t.	Col.	Sal.
1	23	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	>600	0	11	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	24	0	0
6	0	7 B	0	0	0
7	11	0	>600	0	0
8	9	7 B	0	0	0
9	11	6 B	9	0	0
10	40	0	>600	0	0
11	14	0	>600	0	0
12	0	0	0	0	0
13	5	5 M--5 B	115	0	0
14	0	11 M--6 B	27	0	0
15	0	6 M--3 B	0	0	0
16	>600	301 M--0 B	9	0	0
17	>600	0	>600	0	0
18	>600	15 M-16 B	>600	0	0

Aerb.: Aerobios a 25°. Aerb m.: Aerobios mesófilos. An.t.: Anaerobios termófilos. col.: presuntos coliformes. Sal.: *Salmonella*.





tificado las colonias desarrolladas en el medio, PCA y que fueron *Bacillus subtilis* y *Micrococcus roseus*. La presencia de bacterias anaerobias termófilas detectadas en algunas de las muestras determinaron el rechazo de las mismas. Las pruebas realizadas para investigar presuntos coliformes y *Salmonella* dieron resultado negativo en las dieciocho muestras de mieles examinadas.

La valoración de las muestras estudiadas se hizo en función del número de gérmenes contabilizados, estableciéndose dos grupos.

Uno formado por las muestras, 1, 2, 4, 6, 8, 12, y 15 las cuales pueden considerarse excelentes bajo el punto de vista bacteriológico.

Otro, en el que están presentes las bacterias anaerobias termófilas. En éste, las muestras nº 3, 5, 9, 14 y 16 con un máximo de 39 bacterias por gramo, y las nº 7, 10, 11, 13, 17 y 18 con elevada concentración, que las hace rechazables para el consumo humano.

Algunos autores como Gilliam (1979b), también encontraron *Bacillus subtilis* en la miel y en otros productos de la colmena; GILLIAM & VALENTINE (1976), lo aislaron del tracto intestinal de las abejas; FARRIS et al. (1985), identificaron bacterias en 52 muestras, entre ellas *B. cereus*, que puede causar fermentación butírica, y *Clostridium beijerinckii* capaz de provocar fermentación butírica o acética; Gillian et al. (1990), encontraron *B. megaterium*, *B. circulans* y *B. alvei* en el 59% de los alimentos almacenados en la colmena, en el 50 % de las mieles y en el 18 % de los pólenes. Estas bacterias producen ácidos grasos, y antibióticos que inhiben el desarrollo de otros organismos competitivos, así como enzimas que favorecen la digestión de los alimentos.

NAKANO & SAKAGUCHI (1991), en un lote de 36 muestras de miel aislaron *Clostridium botulinum*, hecho que no se repitió en lotes posteriores. Los autores pensaron que la bacteria no procedía de la miel, sino que se habría desarrollado en las larvas muertas.

Por nuestra parte los resultados obtenidos

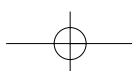
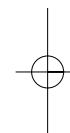
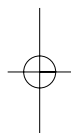
nos permiten afirmar que, bajo el punto de vista microbiológico y organoléptico, el 39% de las muestras de miel analizadas reúnen las condiciones de salubridad precisa, y pueden por tanto, destinarse al consumo humano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Dirección Regional de Educación, Consejería de Cultura, Educación y Turismo de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Proyecto: PCT89/33 la ayuda concedida para la realización de este trabajo y del precedente y complementario "Espectro polínico y cuantificación del sedimento y cenizas de mieles producidas en la Región de Murcia (España).

BIBLIOGRAFÍA

- ALEXOPOULOS, C. J. y MINS, C. W.. 1985. *Introducción a la Micología*. Barcelona: Ed.Omega.
- BAÑO BREIS, F., CANDELA CASTILLO, M. E., EGEA GILABERT, C y PÉREZ SÁNCHEZ, M. C. 1993. Espectro Polínico y Cuantificación del Sedimento y Cenizas de Mieles Producidas en la Región de Murcia, España. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 33.: 71-85.
- BARNETT, H. L. y HUNTER, B. B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Mineapolis, Minnesote. Burgess Publishing Company.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. y YARROW D. 1983. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.
- BETTS, A. D. 1912. The fungi of the beehive. *J. Ecom. Biol.* 7: 129-162.
- BERGEY'S 1984. *Manual of Sistematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. London.
- COLLINS Y LYNE'S 1989. *Microbiological*



- Methods*. Butterwoth Heinemahh. London.
- FARRIS, G. A., FATICHENTI, F. y DEIANA, P. 1981. Caratterizzazione microbiologica dei mieli della Sardegna. *Tecnologie Alimentari*. 10: 18-23.
- FARRIS, G. A., FATICHENTI, F., DEIANA, P. y FORTELEONI, M. 1985. Ulteriore Contributo alla conoscenza della composizione microbiologica dei mieli della Sardegna. *Apicolt mod*. 76: 133-140.
- FURUTA, T. y OKIMOTO, Y. 1975. Study on yeasts in honey. *Bull. Fac. Agr. Tamagana Univ*. 15: 27-43.
- GILLIAM, M. y PREST, D. P. 1972. Fungi isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol*. 20: 101-103.
- GILLIAM, M. y VALENTINE, D. K. 1976. Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging worker honey bees: the genus *Bacillus*. *J. Invertebr. Pathol*. 28: 275-276.
- GILLIAM, M. y MORTON, H. L. 1978. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honey bees. *Apis mellifera*, fed 2,4-D and antibiotics. *Apidologie*, 9: 213-221.
- GILLIAM, M. 1979a. Microbiology of pollen and bee-bread: the yeasts. *Apidologie*. 10: 43-53.
- GILLIAM, M. 1979b. Microbiology of pollen and bee-bread 3a 1d: the genus *Bacillus*. *Apidologie*. 10: 269-274.
- GILLIAM, M., PREST, D. B. y LORENS, B. J. 1989. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*. 20: 53-68.
- GILLIAM, M., ROUBIK, D. W. y LORENS, B. J. 1990. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*. 21: 89-97.
- KLUNGNESS L. M. y PENG Y. 1983. A scanning electron microscopic study of pollen loads collected and stored by honeybees. *J. Apic. Res*. 22: 264-271.
- KREGER-van RIJ, N. J. W. 1984. The Yeasts, *A Taxonomie study*. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam.
- NAKANO, H. y SAKAGUCHI, G. 1991. An unusually heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. *FEMS Microbiology Letters*. 79: 171-178.
- PONCINI, L. y WIMMER, F. L. 1986. Characterization of the yeasts (*Blastomycetes*) in some fujian honeys. *Acta Alimentaria Polonica*. 12: 143-151.
- WEBSTER, J. 1970. *Introduction to Fungi*. At the University press. ed Omega. Cambridge.

