

Revista Electrónica Nova Scientia

Micoflora asociada a granos de polen recolectados por abejas domésticas (*Apis mellifera* L)

Mycoflora Associated to Bee Pollen Collected by Domesticated Bees (*Apis mellifera* L)

Carlos Manuel Bucio Villalobos^{1,2}, Gustavo López Preciado¹, Oscar Alejandro Martínez Jaime² y Juan José Torres Morales³

¹ Escuela de Agronomía, Universidad De La Salle Bajío, León, Gto.

² Departamento de Agronomía de la División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Irapuato, Gto.

³ EPI, Universidad de Guanajuato, Irapuato, Gto.

México

Carlos Manuel Bucio Villalobos. Ex-Hacienda El Copal, Km 9 carretera Irapuato-Silao, CP 36821, Irapuato, Gto.
E-mail: buciovillalobos@yahoo.com.mx

© Universidad De La Salle Bajío (México)

Resumen

Introducción: El polen cosechado de las explotaciones apícolas puede verse colonizado con hongos potencialmente toxigénicos durante su producción o almacenamiento, cuyas toxinas pueden tener consecuencias graves sobre la salud de las personas que lo consuman. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar el grado de contaminación con hongos en 19 muestras de polen recolectado por las abejas, obtenidas en la ciudad de León, Gto.

Método: 19 muestras de polen en diferentes presentaciones comerciales fueron obtenidas en tiendas naturistas de León, Gto., y fueron procesadas por triplicado colocando 100 gránulos sobre el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar, e incubados por siete días a 25 °C. Al final del período de incubación se cuantificó el número de gránulos colonizados por los diferentes hongos.

Resultados y Discusión: Los resultados mostraron que las tres muestras con mayor contaminación de hongos (98, 100 y 100 %) fueron manejadas a granel, resultado similar al obtenido en un estudio previo realizado en 2007 con muestras recolectadas en la ciudad de Irapuato, Gto. Por otro lado, la contaminación de las muestras empacadas en envases de plástico duro (con y sin sellos en sus tapas) tendieron a ser bajas, en contraste con lo encontrado en el estudio previo ya citado, donde hubo muestras envasadas de esa forma con más del 90 % de contaminación, lo que indica que el grado de contaminación no es consecuencia solamente de la forma de envasar el polen. La incidencia de los hongos encontrados fue en general baja: *Aspergillus* (3.6 %), *Alternaria* (3.6 %), *Mucor* (3.1 %), *Fusarium* (2.9 %), *Penicillium* (2.9 %) y *Rhizopus* (0.7 %), habiéndose encontrado dentro del género *Aspergillus* la especie *A. flavus*, la cual puede incluir cepas capaces de producir aflatoxinas. Esta especie fue detectada en 4 de las 19 muestras analizadas, con incidencias de 27, 14, 10 y 1 %, las cuales fueron más altas que las encontradas en el estudio previo hecho en 2007 donde éstas no pasaron del 2 %. Se constata con esto, que la presencia de hongos potencialmente toxigénicos puede variar de lugar en lugar o en distintos años.

Conclusión: En el presente estudio preliminar se encontraron muestras de polen de abeja desde 0 hasta 100 % contaminadas con los diferentes hongos identificados, demostrándose además la presencia de hongos potencialmente toxigénicos. Se recomienda realizar estudios futuros para evaluar la contaminación natural del polen con micotoxinas, así como el determinar los puntos

críticos de contaminación a lo largo del proceso de producción, secado, envasado y comercialización del mismo, con vías a establecer estrategias de control.

Palabras Clave: Hongos toxigénicos, polen de abeja, micotoxinas.

Recepción: 07-08-09

Aceptación: 11-05-10

Abstract

Introduction: Bee pollen that is harvested from apicultural businesses can be colonized with fungi potentially toxigenics during its production or storage, whose toxins can produce serious consequences on the health of people who consume them. The objective of the present research was to quantify degree of contamination with fungi in 19 samples of bee pollen obtained in León, Gto. city.

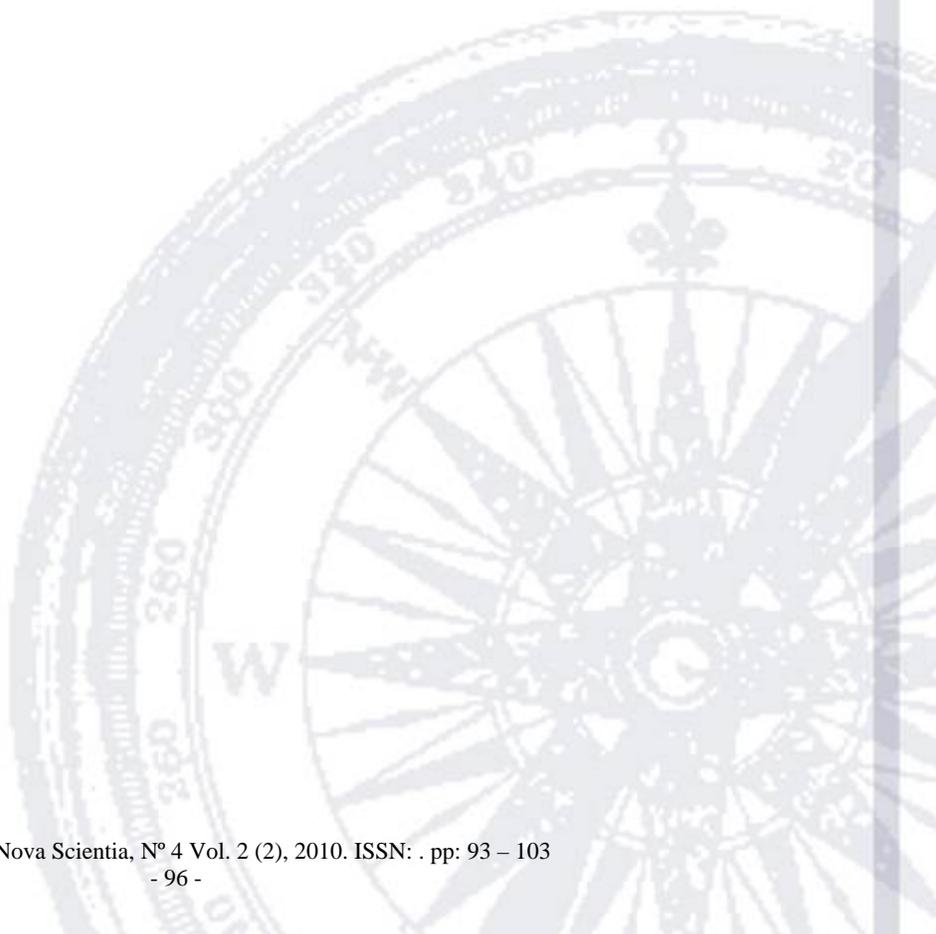
Method: 19 samples of bee pollen in different commercial presentations, were obtained in natural products stores from Leon, Gto., and were processed by triplicate placed 100 grains on Potato Dextrose Agar, and incubated by seven days to 25 °C. At the end of the period of incubation the number of grains colonized by the different fungi was quantified.

Results and Discussion: Results showed that the three samples with highest contamination with fungi (98, 100 and 100 %) were handled without packages, similar result to the obtained in a previous research realised in 2007 with samples collected in Irapuato, Gto. city. The contamination of samples handled in plastic packages (with and without seals in its covers) was low; this results contrast to observed in the previous research, where the contamination was greater to 90 % in some samples, which indicates that contamination is not consequence only of kind to package bee pollen. Incidence of fungi was generally low: *Aspergillus* (3.6 %), *Alternaria* (3.6 %), *Mucor* (3.1 %), *Fusarium* (2.9 %), *Penicillium* (2.9 %) and *Rhizopus* (0.7 %); within the

Aspergillus genera was found *A. flavus* species, which is potentially producing aflatoxins. This species was detected in 4 of 19 analyzed samples, with incidences of 27, 14, 10 and 1 %, which were higher than found in previous research where the contamination was not greater to 2%, which demonstrated that the presence of potentially toxigenic fungi can vary of place in place or different years.

Conclusion: In the present preliminary study, contamination with fungi of bee pollen samples were from 0 to 100 %, demonstrating the presence of potentially toxigenic fungi. Future researches are recommended for evaluate the natural mycotoxins contamination of bee pollen, as well as determining strategies of mycotoxins control during production process, drying, packaging and commercialization of bee pollen.

Keywords: Toxigenic fungi, pollen bee, mycotoxins.



Introducción

Uno de los productos cosechados de una explotación apícola es el polen, el cual es consumido por las personas como un complemento alimenticio, atribuyéndosele también propiedades terapéuticas (Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana, 2002; Gutiérrez, 2004). Para garantizar su inocuidad, el polen debe estar libre de toxinas producidas por diversos hongos capaces de colonizar ese sustrato, entre los que se encuentran principalmente algunas especies de *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Estos hongos pueden producir diversas micotoxinas, entre las que se pueden mencionar las aflatoxinas, fumonicinas, ocratoxinas, deoxinivalenol, zearalenona, toxina T2, etc., causantes de diversos daños en los humanos y animales que las consumen (Steyn y Stander, 1999). *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* son hongos particularmente importantes por poderse crecer en una gran variedad de sustratos donde pueden producir aflatoxinas (Bhattacharya y Raha, 2002). Estos compuestos son extremadamente tóxicos y pueden unirse al ADN humano y animal formando aductos que originan cáncer en ciertas especies animales (Wang y Groopman, 1999). La carcinogénesis producida por las aflatoxinas en humanos es menos clara, pero se ha correlacionado positivamente con el consumo de alimentos contaminados en algunas partes del mundo (Egal *et al.*, 2005). La contaminación de granos y otros sustratos con aflatoxinas fue un problema de almacén durante los primeros años después de su descubrimiento al inicio de los 70's, y posteriormente se descubrió que dicha contaminación podía darse desde que las plantas se encontraban en el campo (Windstrom, 1992). Estas condiciones dan la posibilidad de que la contaminación toxicogénica del polen de abeja pueda darse desde su producción en las colmenas, tanto como durante su almacenamiento.

Los granos de polen son cosechados de las colmenas mediante el uso de trampas especiales, para posteriormente eliminarles el exceso de humedad y almacenarlos (a granel o envasado) hasta su consumo. La contaminación del polen con hongos se puede dar en todo el proceso de producción y almacenamiento. En campo, se ha demostrado la presencia de los hongos *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* en el tubo digestivo de las abejas, así como en la miel y otras provisiones de estos insectos (Batra *et al.*, 1973). Algunos de los hongos podrían tener su origen en las plantas de donde las abejas toman el polen, por ejemplo *Helminthosporium*, hongo típicamente fitopatógeno, fue aislado de una muestra de polen procesada en Irapuato, Gto. (Bucio-Villalobos *et al.*, 2007). Posteriormente, durante el proceso de secado y almacenamiento por parte del

productor, el industrial, el comerciante y/o el consumidor, el polen será siempre susceptible de ser colonizado por hongos típicos de almacén, tales como *Aspergillus* y *Penicillium*.

En un estudio previo (Bucio-Villalobos *et al.*, 2007), se recolectaron ocho muestras de polen de abeja en diferentes expendios de Irapuato, Gto., resultando algunas de ellas altamente contaminadas con *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Aspergillus*, incluyéndose dentro de este último género las especies potencialmente toxigénicas *A. flavus* y *A. parasiticus*. En dicho estudio se sugirió una extensión de la investigación donde se incluyeran un mayor número de muestras, razón por la cual en el presente trabajo se planteó el objetivo de cuantificar el grado de contaminación con hongos en 19 muestras de polen recolectado por las abejas, obtenidas de tiendas naturistas de la ciudad de León, Gto.

Método

Procedencia del polen. Diecinueve muestras de polen fueron obtenidas de 34 tiendas naturistas registradas en el año 2008 en www.seccion.amarilla.com.mx/listados.aspx de la ciudad de León, Gto. Sus presentaciones fueron de dos tipos: 9 muestras fueron en forma de polen a granel (en bolsa de plástico o envase de plástico blando desechable) y 10 en forma de polen empacado en pequeños frascos de plástico compacto con o sin marca comercial, existiendo en este caso dos modalidades: con y sin sello de garantía en sus tapas (5 y 5 respectivamente).

Manejo del polen en el laboratorio. Todas las muestras de polen se encontraban en estado seco y fueron guardadas a temperatura ambiente hasta su proceso. Después de homogenizar, de cada muestra se tomaron al azar 300 granos de polen, y dentro de la campana de flujo laminar, se sembraron 20 granos por caja de Petri sobre la superficie del medio Papa Dextrosa Agar, con el fin de que se desarrollaran en su caso colonias originadas de las esporas o micelio presentes como inóculo en el polen. Las cajas de Petri fueron incubadas durante siete días a 25 °C.

Variable evaluada. Después del período de incubación, se cuantificó el número de gránulos colonizados por los diferentes hongos, expresando los resultados en porcentaje (variable dependiente). Mediante observación colonial y microscópica de las estructuras fungosas, los hongos fueron identificados utilizando las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y Klich y Pitt (1988). Como consecuencia de la no normalidad en la variable dependiente, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, que es la alternativa no paramétrica al análisis de varianza de una vía.

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se pueden observar los resultados promedio de la contaminación fúngica total para las tres formas de manejo de polen de las muestras procesadas. La prueba de Kruskal-Wallis indicó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95.0 %, lo que indica que la forma en que el polen es finalmente puesto a la venta no influyó en el nivel de contaminación. Aunque el promedio de contaminación no pasó del 38.1 %, el rango entre las muestras analizadas fue desde 0 hasta 100 %; las tres muestras que resultaron más contaminadas tuvieron porcentajes del 98 al 100 % y fueron manejadas a granel en donde se despachan cantidades variables en una bolsa de plástico, o en envases de plástico blando desechable. Este resultado es similar al obtenido en 2007 con muestras recolectadas en la ciudad de Irapuato, Gto., en donde todas las presentaciones que manejaron el polen a granel resultaron con los más altos niveles de contaminación, en especial aquellas muestras donde el polen se vendió a granel, resultando una de ellas con el 100 % de los gránulos de polen contaminados con algún tipo de hongo (Bucio-Villalobos *et al.*, 2007).

El manejo de polen envasado en frascos de plástico compacto de diferentes tamaños, es una presentación común para su venta en las tiendas de productos naturistas; en este estudio, la contaminación con hongos encontrada en ese tipo de presentación (con y sin sellos de garantía en sus tapas) fue baja y en promedio no pasó del 4.4 % (Figura 1); sin embargo en el estudio previo ya citado, se encontraron muestras envasadas de esa forma con más del 90 % de contaminación con hongos. Lo anterior indica que el grado de contaminación no es consecuencia solamente de la forma de envasar el polen, aunque existe una tendencia a encontrar muestras altamente contaminadas cuando el polen no tiene algún tipo de cuidado en su empaque (por ejemplo cuando se vende a granel), pues no se descarta la posibilidad de envasarlo utilizando polen previamente contaminado.

Existen otros factores que influyen en la contaminación del polen con hongos, tales como el manejo durante su cosecha y proceso, o el tiempo de almacenamiento, tanto por parte del apicultor como de quien lo industrializa, comercializa o consume. La humedad del polen y las condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura) bajo las que se almacena también son factores determinantes en la presencia de los hongos de almacén (García-Villanova *et al.*, 2004).

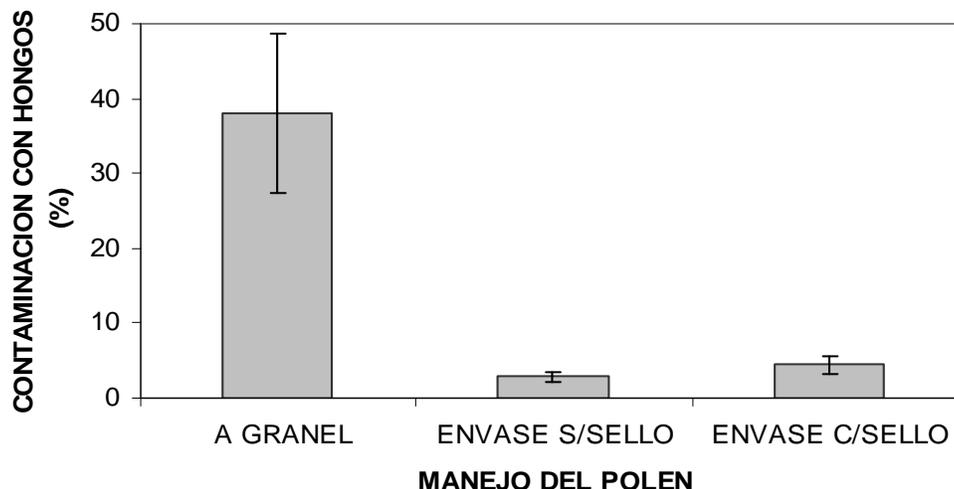


Figura 1. Porcentaje promedio de contaminación fúngica en muestras de polen recolectado por las abejas en tres presentaciones comercializadas en León, Gto.

En el Figura 2 se presentan los géneros de los hongos identificados en las diferentes muestras objeto del presente estudio. A diferencia de los resultados obtenidos en un estudio similar hecho en 2007 (Bucio-Villalobos *et al.*, 2007), los promedios de contaminación con los diferentes hongos fueron bajos: *Aspergillus* (3.6 %), *Alternaria* (3.6 %), *Mucor* (3.1 %), *Fusarium* (2.9 %), *Penicillium* (2.9 %) y *Rhizopus* (0.7 %), no habiendo encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las medianas a un nivel de confianza del 95.0 %, en función de la prueba de Kruskal-Wallis; en contraste a lo aquí reportado, en dicho estudio el género mas frecuente fue *Penicillium* con un 35.3 % de incidencia, lo que coincide con González *et al.* (2005) quienes en un estudio hecho en España obtuvieron a *Penicillium* como uno de los hongos predominantes. Cabe mencionar que dentro del género *Aspergillus* fue identificada, entre otras, la especie *A. flavus*, la cual puede incluir cepas capaces de producir aflatoxinas. Esta especie fue detectada en 4 de las 19 muestras analizadas, con incidencias de 1, 10, 14 y 27 %. Estas incidencias fueron mas altas que las encontradas en una investigación previa (Bucio-Villalobos *et al.*, 2007) donde no pasaron del 2 %. Se constata con esto, que la presencia de hongos potencialmente toxigénicos puede variar de lugar en lugar o en distintos años. Todos los géneros de hongos antes mencionados fueron aislados de las muestras de polen envasado a granel, mientras que para el polen envasado en frascos de plástico compacto con y sin sellos de garantía, los géneros encontrados fueron: *Penicillium*, *Alternaria* y *Fusarium*; la especie *A. flavus* solo fue encontrada en el polen manejado a granel.

Es importante insistir en la necesidad de realizar estudios futuros para determinar la contaminación natural con micotoxinas en el polen de abeja, o evaluar en laboratorio la capacidad productora de dichas toxinas de las especies de hongos encontradas, como en otro estudio ya se ha realizado y en donde se han aislado hongos de gránulos de polen y demostrado su capacidad de producir ocratoxina A y aflatoxina B₁ y B₂ (González *et al.*, 2005). Debe considerarse que el polen es un sustrato que estimula la producción de ocratoxina A cuando es adicionado al medio de cultivo donde se hace crecer *Aspergillus ochraceus* (Medina *et al.*, 2004), fenómeno que podría suceder de manera natural en polen almacenado bajo condiciones no adecuadas.

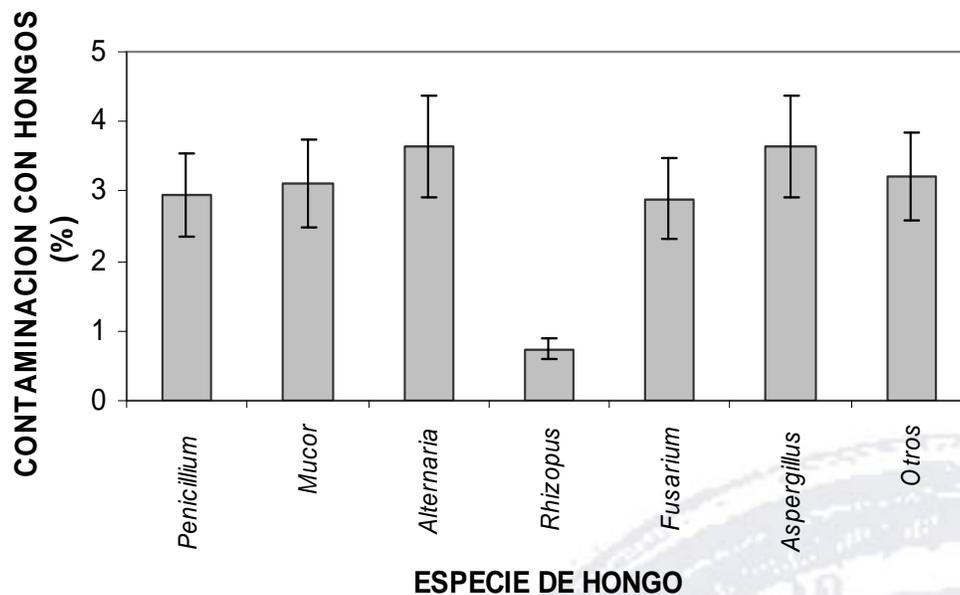


Figura 2. Porcentaje promedio de contaminación con diferentes géneros de hongos en muestras de polen recolectado por abejas y comercializado en León, Gto.

Conclusiones

En este estudio preliminar de tipo descriptivo, se demostró la presencia de hongos potencialmente toxigénicos en el polen recolectado por las abejas, existiendo un diferencial amplio al encontrar muestras sin dicha contaminación, contrastando con muestras 100 % contaminadas. Esto puede considerarse como un foco de alerta por lo que se recomienda continuar con estudios de tipo micotoxicológico para estar en condiciones de sugerir medidas que podrían ser adaptadas por el productor apícola, si los puntos críticos de contaminación se encuentran en la cosecha del polen, su secado o el almacenamiento en las bodegas apícolas, actividades que los apicultores realizan

antes de vender el polen, o bien a los industriales, comercializadores y consumidores si dichos puntos críticos se encuentran durante el envasado o almacenado realizados en esas instancias. Los estudios toxicológicos demostrarían la posibilidad de que las muestras de polen superen la cantidad de micotoxinas máximas tolerables que las autoridades sanitarias de México deberán establecer y que las harían peligrosas para su consumo, mientras que los estudios microbiológicos, como el presente, aportan información sobre la cantidad de inóculo fúngico presente, importante si el polen será almacenado por algún tiempo.

Agradecimientos

A la Universidad De La Salle Bajío por el apoyo económico otorgado a través de la 5ª Convocatoria de Investigación, gracias al cual se pudo desarrollar el presente proyecto.

A la Universidad de Guanajuato quien con un apoyo complementario ayudó igualmente al buen éxito del proyecto.

Referencias

- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition. APS Perss. USA. 218 p.
- Batra, L.R., S.W.T. Batra y G.E. Bohart. (1973). The mycoflora of domesticated and wild bees (Apoidea). Mycopathologia 49:13-44.
- Bhattacharya, K y S. Raha. (2002). Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean by fungi in storage. Mycopathologia 155:135-141.
- Bucio-Villalobos, C.M., O.A. Martínez-Jaime y J.J. Torres-Morales. (2007). Hongos asociados al polen recolectado por las abejas. Memorias del IX Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos. Guanajuato, Gto. p 301-306.
- Egal, S., A. Hounsa, Y.Y. Gong, P.C. Turner, C.P. Wild, A.J. May, K. Hell y K.F. Cardwell. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. Int. J. Food Microbiol. 104:215-224.
- García-Villanova, R.J., C. Cordón, A.M. González-Paramás, P. Aparicio y M.E. García-Rosales. (2004). Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. J. Agric. Food Chem. 52:7235-7239.

- González, G., M.J. Hinojo, R. Mateo, A. Medina y M. Jiménez. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* 15:1-9.
- Gutiérrez, A.S. (2004). Empleo terapéutico de los productos apícolas, dosis, formulaciones, reacciones adversas y contraindicaciones. *Memorias del 11° Congreso Internacional de Actualización Apícola.* Monterrey, N. L. México. p 146-153.
- Klich, M.A. y J.I. Pitt. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 91:99-108.
- Medina, A., G. González, J.M. Sáez, R. Mateo y M. Jiménez. (2004). Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:261-267.
- Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana. (2002). Producción de Polen. Manual 8. SAGARPA. Programa Nacional para el Control de la Abeja Africana e Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. México. 28 p.
- Steyn, P.S. y M.A. Stander. (1999). Mycotoxins as causal factors of diseases in humans. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 18:229-243.
- Wang, J.S. y J.D. Groopman. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Res.* 424:167-181.
- Windstrom, N.W. (1992). Aflatoxin developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. In: Bhatnagar, D., E.B. Lillehoj y D.K. Arora (eds). *Handbook of Applied Mycology. Vol 5: Mycotoxins in Ecological System.* Marcel Dekker, Inc. USA. p 23-58.