

# Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola

**Carlos Alberto del Risco-Ríos, Adolfo Pérez-Piñero, Victoria Pazos Álvarez-Rivera,\* Giselle Rodríguez-Castro, Virginia Leiva-Castillo,\*\* Yamila Puig-Peña\*\* y Rosalina García-Neninger.**

Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera Cano-Wajay, kilómetro 0, El Cano, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba. Correo electrónico: carlos@eeapi.cu \*Facultad de Biología, Calle 25, entre calles I y J, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. \*\*Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Calzada de Infanta, No. 1158, entre Clavel y Llinás, Centro Habana, La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de noviembre de 2010

Aceptado: 27 de septiembre de 2011

Palabras clave: ensilaje, polen apícola, bacterias ácido lácticas, fermentación, pan de abejas.  
Key words: silage, bee pollen, lactic acid bacteria, fermentation, bee bread.

**RESUMEN.** El polen apícola es un alimento con propiedades nutricionales y terapéuticas demostradas para el hombre y en Cuba pudiera constituir un renglón económico importante, lo que no es posible actualmente por exceder las especificaciones microbiológicas de este producto. Con el objetivo de utilizar bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola y obtener un producto con calidad microbiológica aceptable, se ensayaron siete cepas de *Lactobacillus* autóctonas del pan de abejas, pertenecientes a las especies *L. plantarum*, *L. coryniformis* y *L. delbrueckii* y tres industriales, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. acidophilus*. Se evaluó la producción de ácido y la capacidad de inhibir la viabilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922. Las cepas más promisorias derivadas del estudio fueron inoculadas en silos de polen diseñados a 24, 29, 36 y 40 % de humedad y a los 15 d fueron analizadas las variables acidez, presencia de coliformes, levaduras y hongos según las normas NC-ISO vigentes. Las bacterias industriales y las autóctonas *L. delbrueckii* (32) y *L. plantarum* (42) fueron las más promisorias, con resultados superiores al 1 % de ácido láctico e inhibición total de la viabilidad de *E. coli*. La evaluación de estas cepas en los silos sugirió que las autóctonas, a 36 y 40 % de humedad, producen la mayor acidez, aproximadamente del 2 % de ácido láctico y una reducción hasta la aceptación de los indicadores microbiológicos según los criterios vigentes para la calidad del polen seco en Cuba y la norma NC-585:2008. El polen ensilado con bacterias ácido-lácticas autóctonas del pan de abejas permite obtener un producto ácido con calidad microbiológica aceptable.

**ABSTRACT.** The bee pollen is a food with nutritional and therapeutic properties for the man, in Cuba could be an economic, but and it is not possible because it exceeds the microbiological specifications for this product. With the aim to use lactic acid bacteria for silage bee pollen and get a product with acceptable microbiological quality, were tested seven strains of *Lactobacillus* autochthonous of the bee bread and belonging to the species *L. plantarum*, *L. coryniformis* and *L. delbrueckii* and three industrials, *L. plantarum*, *L. casei* and *L. acidophilus*. It was evaluated the production of acid and the capacity to inhibit the viability of *Escherichia coli* ATCC 25922 strain. The most promising were inoculated in silos of pollen designed to 24, 29, 36 and 40 % humidity, to the 15 d were analyzed variables acidity, total coliforms, yeasts and fungi according to the NC-ISO standards. The results were processed statistically through a double ANOVA. The industrial bacteria and autochthonous, 42-*L. plantarum* and 32-*L. delbrueckii* were the most promising, with results above 1 % lactic acid and total inhibition of *E. coli*. The inoculation of these strains in silos suggested that the autochthonous, 36 - 40 % humidity, produce more acid, about 2 % lactic acid, and reduction to the acceptance of microbiological indicators. The silage pollen with lactic acid bacteria autochthonous of the bee bread permits to get acid product with acceptable microbiological quality.

## INTRODUCCIÓN

Los granos de polen apícola son el resultado de la aglutinación de las células de polen floral por las abejas *Apis mellifera*, las cuales transportan el polen a la colmena y lo ensilan en las celdas de los panales donde se transforma en pan de abejas.<sup>1,2</sup> La conversión del polen en pan de abejas es el resultado de la acción microbiana, fundamentalmente a través de una fermentación ácido láctica.<sup>3</sup>

El polen apícola que se cosecha y seca por los apicultores se promueve como un alimento saludable con un amplio espectro de propiedades nutricionales y terapéuticas.<sup>4-8</sup> Sin embargo, se ha comprobado en varios países

que tiene elevados recuentos de organismos indicadores de la calidad sanitaria, principalmente: microorganismos a 30 °C, hongos filamentosos, levaduras y coliformes totales.<sup>9-12</sup> Cuba no está exenta de esta regularidad y el polen que se obtiene posee una elevada carga microbiana que invalida su comercialización.<sup>13,14</sup> Dado que el polen se consume crudo y no se utilizan prácticas de intervención que puedan controlar o disminuir eficazmente la microbiota, pudiera constituir una fuente potencial de enfermedades de transmisión alimentaria.

Con el propósito de disminuir la carga microbiana del polen, se realizó su ensilaje espontáneo sin inoculación de bacterias ácido-lácticas, con resultados microbioló-

gicos aceptables.<sup>15</sup> Con el nuevo producto, denominado "Pan de Abejas Industrial", se elaboraron y comercializaron mezclas apícolas de elevado valor nutricional. Debido a la falta de inoculación microbiana que garantizara la presencia dominante de bacterias ácido-lácticas y el predominio de otros microorganismos propios del polen apícola empleado como materia prima, varias producciones de "Pan de Abejas" fueron rechazadas.

Teniendo en cuenta que Cuba posee una vegetación polínifera durante casi todo el año, la comercialización del polen pudiera constituir una fuente de ingreso importante. Por tal razón, es necesario emplear cepas ácido-lácticas que acidifiquen y disminuyan la microbiota del polen (actividad antagonista), para inocular posteriormente los ensilajes de modo que el proceso se desarrolle de manera dirigida con el fin de obtener una calidad microbiológica aceptable en el producto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación experimental se llevó a cabo durante el período de diciembre de 2006 a enero de 2010.

### Bacterias ácido-lácticas empleadas en la investigación

Se utilizaron siete cepas de *Lactobacillus* provenientes del Centro de Investigaciones Apícolas del Ministerio de la Agricultura de la República de Cuba, aisladas del pan de abejas, identificadas por pruebas bioquímicas clásicas como *L. plantarum*, *L. coryniformis* y *L. delbrueckii* y codificadas como 1, 14, 15, 29, 32, 41 y 42.<sup>16</sup> Además, se probaron las bacterias *L. plantarum*, *L. casei* y *L. acidophilus* empleadas en la industria y procedentes del banco de cepas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, reportadas como probióticas y adecuadas para la conservación de alimentos.<sup>17,18</sup> Todas fueron conservadas por liofilización.

### Evaluación de la producción de ácido por las bacterias ácido-lácticas

Las cepas propagadas previamente se inocularon al 2 % en el medio caldo MRS (peptona, extracto de carne y levadura, glucosa, tween 80, fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato triamónico, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso) (Merck, Alemania),<sup>19</sup> suplementado con glucosa al 5 % y se incubaron a 35 °C. La producción de ácido se evaluó por valoración con hidróxido de sodio 0,1 mol · L<sup>-1</sup> al inicio y cada 24 h, hasta obtener tres titulaciones sucesivas con el mismo resultado (acidez final).<sup>20</sup> A la acidez final se le sustrajo la inicial y se obtuvo la acidez producida por cada cepa, expresada como por ácido láctico (%).

### Evaluación de la actividad antagonista de las bacterias ácido-lácticas

Las cepas ácido-lácticas y *Escherichia coli* ATCC 25922 se hicieron crecer juntas en el medio caldo MRS. Esta última, se inoculó con una concentración aproximada de 10<sup>3</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC · mL<sup>-1</sup>) y las ácido-lácticas al 2 % a partir de un cultivo realizado previamente. Como control de ensayo se inoculó solo *E. coli* en el mismo medio. Todos los ensayos y el control se incubaron a 35 °C y a las 24 h, se cuantificó la enterobacteria por el método de las diluciones seriadas en disolución salina con Triptona C (BioCen, Cuba) y siembra por duplicado en el medio Agar Mac Conkey (BioCen, Cuba). Los recuentos de *E. coli* se expresaron como el logaritmo en base 10 del número de unidades formadoras de colonias obtenidas. La capacidad antagonista se consideró positiva cuando

se observó un decremento de la viabilidad de *E. coli* en los tratamientos con respecto al control.

Las cepas que produjeron mayor acidez e inhibición del crecimiento de *E. coli* se evaluaron como inóculo en el ensilaje de polen apícola.

### Selección de las cepas para ensilar polen apícola

Se realizó un diseño de bloques al azar y se determinó el efecto de la humedad (%) y el tipo de inóculo en silos elaborados con polen apícola seco de producción a escala de laboratorio e incubados a 35 °C por 15 d. La humedad se mantuvo entre el 24 % (valor medio determinado para el polen apícola en investigaciones previas) y el 40 % (referido por Pérez y cols. para el ensilaje espontáneo del polen apícola).<sup>21,15</sup> Como variantes de inóculo se utilizaron las cepas seleccionadas a una concentración en los silos de 10<sup>6</sup> UFC · g<sup>-1</sup>. Las variables de respuesta evaluadas fueron la acidez producida y los indicadores sanitarios: coliformes totales, levaduras y hongos filamentosos.<sup>20,22,23</sup> Los datos microbiológicos se expresaron como el logaritmo en base 10 de los recuentos obtenidos al inicio y al finalizar los ensilajes.

### Tratamiento estadístico

Todos los tratamientos se realizaron con tres réplicas; previo al análisis estadístico se comprobó a través de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors y de Levene que los datos cumplían una distribución normal y homogeneidad de varianzas respectivamente. Los resultados fueron procesados a través de una prueba ANOVA de clasificación simple para la evaluación de las cepas y doble para la selección en el ensilaje del polen apícola, con la prueba de Tukey y un grado de confianza del 95 % en el paquete estadístico SPSS versión 12.0.<sup>24</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Producción de ácido y actividad antagonista de las cepas ácido-lácticas

Las cepas industriales resultaron significativamente las más acidificantes del medio MRS, con un contenido de ácido láctico entre 1,27 y 1,75 %. Entre las aisladas del pan de abejas (autóctonas) solo sobrepasaron el 1 % de ácido láctico las cepas 32 (*L. delbrueckii*) y 42 (*L. plantarum*) sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 1).

En la evaluación de la actividad antagonista se observó una inhibición total de la viabilidad de *E. coli* por las tres cepas industriales y las autóctonas 32 y 42, las restantes disminuyeron la viabilidad de la enterobacteria aproximadamente en siete órdenes logarítmicos con respecto al control, con diferencias significativas (Tabla 1).

Las cepas más acidificantes mostraron una inhibición total de *E. coli* y a medida que la acidez fue menor la enterobacteria se pudo cuantificar con un aumento progresivo y significativo. La acción antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas está dada por la producción de ácido láctico fundamentalmente y otras sustancias inhibidoras tales como diacetilo (2,3-Butanodiona), peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas.<sup>25</sup> Los ácidos orgánicos de cadena corta cruzan la membrana celular y en el medio citoplasmático neutro (pH 0) se disocian con liberación de protones (H<sup>+</sup>), con lo cual se acidifica el citoplasma. Las células, para mantener el equilibrio, expulsan los protones con la energía necesaria para el crecimiento, por lo que su desarrollo es afectado a medida que aumenta la acidez en el medio.<sup>26</sup>

Resultados similares de acidificación y actividad antagonista por bacterias ácido-lácticas han sido reportados

recientemente. Las cepas de *Lactobacillus johnsonii* identificadas por Carina y cols. a partir del intestino de abejas obreras producen entre 0,9 y 2,5 % de ácido láctico, con inhibición *in vitro* de cepas patógenas humanas como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *E. coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus*.<sup>27</sup>

Las tres cepas industriales y las autóctonas 32 y 42 fueron seleccionadas para su inoculación en los ensilajes de polen a escala de laboratorio.

### Selección de las cepas para ensilar polen apícola

#### Acidez producida

En el diseño experimental, el factor humedad y el tipo de inóculo tuvieron efectos significativos sobre la variable acidez. Los resultados de la acidez en los silos inoculados con las cepas autóctonas, se incrementaron a medida que aumentó la humedad en el diseño, sin diferencias significativas entre los tratamientos ajustados a 24 y 29 % y entre 36 y 40 %, pero sí entre los silos pertenecientes a estos dos grupos. No se observaron diferencias significativas en la producción de ácido entre las cepas autóctonas, las cuales fueron significativamente más productoras de ácido láctico

que las industriales. Las bacterias autóctonas acidificaron el medio con un aporte próximo al 2 % de ácido láctico en las humedades superiores, lo cual representó aproximadamente el doble de la acidez obtenida en las humedades inferiores (Tabla 2).

El polen apícola no fue un sustrato adecuado para el desarrollo de las bacterias industriales, puesto que no se observó un aumento progresivo de la acidez con el incremento de la humedad. Este efecto pudo deberse al predominio de la microbiota propia del polen, que al ser muy diversa produce metabolitos ácidos o alcalinos.<sup>28</sup>

Es importante señalar que las cepas industriales fueron superiores a las autóctonas 32 y 42 en cuanto a la acidificación del medio MRS. Sin embargo, en los silos de polen apícola ocurrió todo lo contrario. Esto pudo deberse a que las cepas autóctonas, al ser aisladas del polen ensilado por las abejas, mantienen un metabolismo adaptado a la composición química de este sustrato y a la concentración de los constituyentes que lo componen, lo cual es apoyado por el hecho de que la acidez producida en los silos de polen a 36 y 40 % de humedad por las bacterias autóctonas fue superior a la producida en el medio MRS.

**Tabla 1.** Acidez producida e influencia sobre la viabilidad de *E. coli* de las cepas ácido-lácticas

Cepas	Acidez producida en ácido láctico (%)	Viabilidad de <i>E. coli</i> Log UFC · mL <sup>-1</sup>
<i>L. casei</i>	1,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	Inhibición total
<i>L. acidophilus</i>	1,56 ± 0,04 <sup>b</sup>	Inhibición total
<i>L. plantarum</i>	1,27 ± 0,01 <sup>c</sup>	Inhibición total
42	1,08 ± 0,03 <sup>d</sup>	Inhibición total
32	1,06 ± 0,03 <sup>d</sup>	Inhibición total
1	0,95 ± 0,05 <sup>e</sup>	0,15 ± 0,21 <sup>a</sup>
15	0,94 ± 0,06 <sup>e</sup>	0,24 ± 0,34 <sup>a</sup>
14	0,92 ± 0,05 <sup>e</sup>	0,90 ± 0,15 <sup>b</sup>
29	0,90 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,03 ± 0,11 <sup>b</sup>
41	0,87 ± 0,07 <sup>e</sup>	1,56 ± 0,11 <sup>c</sup>
Control, medio MRS	0,32 ± 0,01 <sup>f</sup>	
Control, <i>E. coli</i> en medio MRS		8,02 ± 0,03 <sup>d</sup>

Significación estadística de los valores medios comparados entre las filas: Acidez:  $p^{(a-b-c-d-e-f)} < 0,05$ ; *E. coli*:  $p^{(a-b-c-d)} < 0,05$ . Los resultados están expresados como la media ± DE de tres valores independientes.

**Tabla 2.** Acidez producida por las cepas ácido-lácticas en silos de polen ajustados a diferentes porcentajes de humedad

Humedad <sup>1</sup> (%)	Acidez producida en ácido láctico (%)				
	Cepas				
	Autóctonas		Industriales		
	32	42	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
24	0,36 ± 0,03 <sup>a*</sup>	0,47 ± 0,11 <sup>a*</sup>	0,49 ± 0,06	0,51 ± 0,17	0,63 ± 0,18
29	1,00 ± 0,11 <sup>a*</sup>	0,60 ± 0,14 <sup>a*</sup>	0,41 ± 0,18	0,44 ± 0,11	0,44 ± 0,21
36	1,98 ± 0,05 <sup>b*</sup>	1,81 ± 0,03 <sup>b*</sup>	0,64 ± 0,03	0,86 ± 0,04	0,36 ± 0,06
40	2,26 ± 0,08 <sup>b*</sup>	2,06 ± 0,21 <sup>b*</sup>	0,51 ± 0,03	0,86 ± 0,53	0,28 ± 0,08

<sup>1</sup> Humedad inicial de los silos. Significación estadística de los valores medios comparados entre las filas: Acidez:  $p^{(a-b)} < 0,05$  y entre las columnas: Acidez:  $p^{(*)} < 0,05$ . Los resultados están expresados como la media ± DE de tres valores independientes.

**Indicadores microbiológicos**

En el recuento microbiológico inicial de los silos ajustados a diferentes porcentajes de humedad se encontró que los indicadores: hongos filamentosos, levaduras y coliformes totales resultaron superiores a dos ( $10^2$  UFC · g<sup>-1</sup>), valor máximo establecido en las especificaciones de calidad del polen apícola vigente en Cuba para los hongos y levaduras y lo dispuesto para los coliformes totales en los alimentos listos para el consumo (Tabla 3).<sup>29,30</sup> A los tratamientos ajustados a 36 y 40 % de humedad e inoculados con las cepas industriales no se les determinaron los indicadores microbiológicos finales por el crecimiento en la superficie de hongos filamentosos en todos los silos, lo cual pudo ser consecuencia de la escasa acidificación que tuvieron estas cepas comparadas con las autóctonas y a los porcentajes de humedad superiores, por lo que el análisis estadístico solo se realizó a las cepas autóctonas.

Entre las cepas autóctonas no tuvo efecto significativo el factor *tipo de inóculo* sobre los recuentos de hongos filamentosos, sin embargo, este indicador disminuyó con el aumento de la humedad en el diseño, sin diferencias significativas entre 36 y 40 %.

Al comparar los recuentos de hongos al inicio y al final de los silos con 24 y 29 % de humedad, se observó que todos los tratamientos disminuyeron aproximadamente este indicador en dos órdenes logarítmicos, incluso en los silos inoculados con las cepas industriales. Por otra parte, todos los tratamientos ajustados a 36 y 40 % de humedad e inoculados con las cepas autóctonas presentaron un decremento de los hongos, aproximadamente en tres órdenes logarítmicos y de este modo, alcanzaron los límites de aceptación para el polen apícola (Tabla 4). Los hongos filamentosos están provistos de esporas que no solo les permiten una fácil y rápida diseminación, también son muy resistentes a los cambios medioambientales.<sup>31</sup> Los indicadores coliformes totales y levaduras no se detectaron en ninguno de los tratamientos una vez concluidos. Esto pudiera estar dado a varios factores: a la acción negativa sobre la fisiología celular de los ácidos orgánicos de cadena corta, como el láctico que se produce en la fermentación<sup>26</sup> y a la producción de bacteriocinas con actividad antimicrobiana por las bacterias ácido-lácticas.<sup>33</sup>

La mayor producción de ácido por las cepas al más bajo porcentaje de agua en los silos garantiza la reducción y estabilidad microbiológica del producto final, por lo que se estima que los silos a 36 % de humedad e inoculados

con las cepas autóctonas son los más promisorios para obtener un producto con calidad microbiológica aceptable.

Resultados similares han sido descritos con respecto al empleo de bacterias ácido-lácticas con un perspectiva uso en el biocontrol de los alimentos y en la salud. Trias, reportó que de 496 cepas ácido-lácticas aisladas de frutas frescas, 23 de ellas tenían actividad antagonista frente a microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*).<sup>34</sup> En otros casos se ha comprobado la actividad antifúngica de cepas de *L. plantarum* aisladas de pastos ensilados y ha sido demostrado que se debe a la producción de ácidos orgánicos, metabolitos de bajo peso molecular y péptidos cíclicos.<sup>35</sup> Por otra parte, Pérez y cols. obtuvieron recuentos aceptables de microorganismos a 30 °C, levaduras, hongos filamentosos y coliformes totales en el ensilaje espontáneo del polen apícola, pero sin la garantía de las producciones al no inocular bacterias ácido-lácticas para dirigir el proceso.<sup>15</sup> En el presente estudio, los microorganismos a 30 °C no fueron evaluados en los silos diseñados porque al inocularse con bacterias ácido-lácticas evidentemente este indicador sería afectado.<sup>26</sup>

**CONCLUSIONES**

El ensilaje del polen apícola a 36 % de humedad, inoculado con las cepas ácido-lácticas *L. delbrueckii* (32) y *L. plantarum* (42) aisladas del pan de abejas, permite obtener un producto fermentado con recuentos aceptables de los indicadores sanitarios: coliformes totales, levaduras y hongos filamentosos, lo que posibilita su potencial comercialización.

**Tabla 3.** Recuentos microbiológicos iniciales de los silos ajustados a diferentes porcentajes de humedad

Humedad de los diferentes silos (%)	Log UFC · g <sup>-1</sup>		
	Hongos filamentosos	Coliformes totales	Levaduras
24	4,31 ± 0,11	3,92 ± 0,33	3,85 ± 0,34
29	4,00 ± 0,38	3,78 ± 0,34	3,71 ± 0,16
36	4,64 ± 0,25	3,78 ± 0,15	3,63 ± 0,13
40	3,93 ± 0,16	3,48 ± 0,25	3,01 ± 0,25

Los resultados están expresados como la media ± DE de tres valores independientes.

**Tabla 4.** Recuentos de hongos filamentosos al finalizar los ensilajes de polen, ajustados a diferentes porcentajes de humedad e inóculo ácido-láctico

Humedad <sup>1</sup> (%)	Log UFC · g <sup>-1</sup>				
	Autóctonas		Industriales		
	32	42	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
24	2,63 ± 0,78 <sup>a*</sup>	2,41 ± 0,67 <sup>a*</sup>	2,49 ± 0,88	2,65 ± 0,57	2,56 ± 0,67
29	2,64 ± 0,48 <sup>a*</sup>	2,66 ± 0,88 <sup>a*</sup>	2,41 ± 0,74	2,31 ± 0,44	2,31 ± 0,86
36	1,51 ± 0,16 <sup>b*</sup>	1,54 ± 0,48 <sup>b*</sup>	-	-	-
40	1,08 ± 0,11 <sup>b*</sup>	1,63 ± 0,89 <sup>b*</sup>	-	-	-

<sup>1</sup> Humedad inicial de los silos. Significación estadística de los valores medios comparados entre las filas: Acidez: p<sup>(a-b)</sup> < 0,05 y entre las columnas: Acidez: p<sup>(\*)</sup> < 0,05. Los resultados están expresados como la media ± DE de tres valores independientes.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Carpes ST. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Journal of Food Technology*. 2009;12(3):222-229.
2. Pérez PA. Manual de apicultura. Cuba: Ed. Agrinfor: 2007;p.82-102.
3. Hegazi AG. La apiterapia y sus componentes. El pan de abejas. Apiterapia [CD ROM]. XXXVII Congreso Internacional de Apimondia, Durban, Sudáfrica; 2001.
4. Cocan O, Marguitas LA, Dezmirean D, Laslo L. Composition and biological activities of bee pollen: review. *Bulletin of the University of Agricultural Science and Veterinary Medicine*. 2005;61 221-226.
5. Hamamoto R, Ishiyama K, Yamaguchi M. Inhibitory effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone resorption in femoral tissues and osteoclast-like cell formation in bone marrow cells in vitro. *Journal of Health Science*. 2006;52(3):268-275.
6. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral diaphyseal and metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Health Science*. 2006;52(1):43-49.
7. Campos MGR, Bogdanov S, Almeida LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 2008;47(2):156-163.
8. Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Agra MF, Silva EMS, Reis IT, et al. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçumarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009;81(2):173-178.
9. Guerra PE, Salamanca GG, Henao RC. Estudio microbiológico de cargas de polen colectado y almacenado por *Apis mellifera* [Internet]. Colombia: Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigaciones Mellitopalínológicas. Universidad del Tolima. 2007 [Consultada 14 junio de 2007]. Disponible en: <http://www.ut.edu.co/investigacion/grupos/m/mpolen.pdf>.
10. Khismatullin R, Kuzyaev R, Lyapunov Y, Elovikova E. Sanitary microbiology of honey bee collected pollen. Document for Small Business and Professionals. 2002. [Consultada 21 octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.docstoc.com/search/honeybee.pollen>.
11. Lyapunov YE, Khismatullin RG, Kuziaev RZ. Enterobacteria of honey bee pollen. *Scientific Programme Apimondia. Ireland* 2005;(336):130.
12. Kacániová M, Pavlicová S, HaĽčík P, Kociubinski G, Kmazovická V, Sudzina M, et al. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2009;56(3):285-295.
13. Valdés G, García O, Ruiz M, Martín M, Giral T. Evaluación de las condiciones higiénicas del polen. *Zootécnica*. 1992;2(1):87-93.
14. Valdés G, Martín M, García O, Ruiz M, Giral T. Evaluación de la calidad sanitaria de diferentes modelos de trampas de polen. *Zootécnica*. 1992;2(1):79-86.
15. Pérez PA, Valdés G, Ruiz M, Martín M. Pan de abejas industrial. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial No. 22327 A1, 1991.
16. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. De Vos P, Garrity GM. Editors. London New York: Ed. Springer Dordrecht Heidelberg: 2009.
17. Hernández MA, Montero GD, Torres PY. Evaluación de cultivos con características probióticas para elaborar una bebida de suero fermentado. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2007;17(3):44-48.
18. Hernández MA, Jaramillo P. Comportamiento de los indicadores físico-químicos de leche fermentada y viabilidad de los microorganismos probióticos. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2004;14(2):7-10.
19. De Man JC, Rogosa M, Sharpe EM. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 1960;23:130
20. NC-ISO 750: 2001. Producto de frutas y vegetales. Determinación de la acidez valorable.
21. Rodríguez Y, del Risco C A, Rodríguez G. Caracterización del polen apícola. (1) Parámetros físico-químicos primarios para determinar la calidad para ser ensilado. *Vida Apícola*. 2009;(156):13-16.
22. NC-ISO 4832: 2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes. Técnica de placa vertida.
23. NC-ISO 7954: 2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C.
24. López R. Diseño estadístico de Experimentos. Ed. Universidad Autónoma de Campeche-Universidad de La Habana. 1995.
25. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiology Reviews*. 1995;59:171-200.
26. Thomas J M, Karl R.M. Microbiología de los alimentos. España: Ed. Acribia: 2009.
27. Carina AM, Torres JM, Sabaté CD, Ibarcuren C, Apella CM. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*. 2011;166:1-13.
28. Tuschner WA. Avances metodológicos orientados a predecir la aptitud de especies forrajeras para ser ensiladas. [Tesis presentada en opción del título de Máster en Ciencias Animales]. Universidad Católica de Chile; Santiago-Chile: 2004.
29. NRAG en Cuba, Apicultura: 1985. Polen Apícola a Granel. Especificaciones de calidad.
30. NC 585:2008. Contaminantes microbiológicos en alimentos-requisitos sanitarios.
31. Leyva V, Martino TZ, Puig Y. Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. En: Caballero A. Temas de higiene de los alimentos. La Habana: Ed. Ciencias Médicas: 2008;p.43-54.
32. Fernández EE. Microorganismos de interés sanitario. En: Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1.ª ed. México: Universidad Autónoma de Querétaro: 2001:p.13-53.
33. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2007;13:194-199.
34. Trias MR. Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables [Dissertação per optar al grau de Doctor de Ciéncias Experimentals i de la Salut]. Universitat de Girona. 2008.
35. Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*. 2005;16:70-78.