

**ABSTRACT.** Honey is one of the oldest natural medicines that exists and has been used as a topical treatment in different processes. This paper includes data for the evaluation of antimicrobial activity of 21 honeys from the Chaco province (Argentina) and 6 honeys in the comarca of Maragateria (León, Spain) on various pathogenic micro-organisms responsible for infections and intoxications food. This diffusion method was used in Muller Hilton agar, with honey undiluted and diluted to 25% in sterile water, by placing an aliquot, duplicate of 30 µl on a barren disc (Difco). We used different concentrations of hydrogen peroxide as positive controls. Tested pathogenic organism was *Staphylococcus aureus* (producer of enterotoxin B own isolation), *Escherichia coli* (own isolation), *Salmonella enteritidis* (CECT), *Listeria monocytogenes* (CECT 4032) and *Clostridium sporogenes* (CECT 892, strain not toxigenic with genetic similarity of 99.7% in Group 1 C. *botulinum*, rRNA sequence). Agar plates Muller Hilton are incubated at 37°C/18 hours in aerobic in trials with *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* and *L. monocytogenes*, and anaerobiosis at 30°C/48 hours for *C. sporogenes*. Antimicrobial activity established by estimation of the areas of inhibition using a planimeter (PLACOM). Diluted honeys did not have antimicrobial activity. However, honeys undiluted this activity was detected in 80%. Of the Chaco honeys presented antimicrobial activity against *S. aureus*, 28.6% against *L. monocytogenes*, 25% against *Salmonella* and 14% against *E. coli*, and none to *C. sporogenes*. Maragatas honeys presented only antimicrobial activity against *S. aureus* (100%), *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*.

## INTRODUCCION

Las mieles de abeja es una de las medicinas naturales más antiguas que existe y ha sido utilizada como tratamiento tópico en distintos procesos (Molan, 1992; Estrada et al., 2005; Dardon et al., 2008). Investigaciones *in vitro* han demostrado su capacidad de control de inhibición frente a distintos microorganismo patógenos responsables de infecciones y toxoinfecciones (McDonnell et al., 1999; Ramirez et al., 2003; Olaitan et al., 2007; Estevinho, et al., 2008, Álvarez-Suárez et al., 2010). Algunas investigaciones realizadas *in vitro* han sugerido la efectividad de la miel frente a bacterias patógenas, tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica* (Willix et al., 1992; Cooper et al., 2000, 2002a, 2002b, French et al., 2005, Iurlina y Fritz, 2005; Ramio et al., 2007; Blair et al., 2009).

La actividad antimicrobiana de las mieles se debe principalmente a su acidez y pH (Mairaj et al., 2008), a su osmolaridad, su baja actividad de agua (aw) y a la generación enzimática de peróxido de hidrógeno vía glucosa oxidasa (Ramirez et al., 2003). Sin embargo, otros componentes de la miel, como ácidos aromáticos o compuestos fenólicos, también pueden contribuir a su actividad antibacteriana (Bergman et al., 1983; Weston, 1999). En miel de Manuka se ha identificado un compuesto específico con actividad antimicrobiana aldehído metilglyoxal derivado de las especies de *Leptospermum* y "apidaecin peptide, bee defensin-1" (Stephens et al. 2009; Kwakman et al. 2010; Majtan 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se recogen las áreas de inhibición para las mieles de la provincia de Chaco y en la tabla 2 para las mieles de la Maragateria. En el gráfico 1 se recogen los valores medios de las áreas de inhibición en cm<sup>2</sup> para cada uno de los microorganismos patógenos del ensayo. Y en el gráfico 2 el porcentaje de muestras que presentaron capacidad antimicrobiana frente a los microorganismos de referencia considerados en el trabajo.

Tabla 1. Capacidad antimicrobiana de mieles de la provincia de Chaco frente a distintos microorganismos patógenos de interés, expresada en cm<sup>2</sup>.

| Miel | E.coli         | Salmonella | S.aureus | L. monocytogenes | C. sporogenes |
|------|----------------|------------|----------|------------------|---------------|
| 1    | - <sup>a</sup> | 3,1        | 3,3      | 2,8              | -             |
| 2    | -              | 2,2        | 3,1      | 0,6              | -             |
| 3    | -              | 1,1        | 2,7      | 3,4              | -             |
| 4    | -              | 1,4        | 3,2      | 3,6              | -             |
| 5    | -              | -          | 1,1      | 2,6              | -             |
| 6    | -              | 1,6        | 3,7      | 5,1              | -             |
| 7    | -              | -          | 2,4      | -                | -             |
| 8    | 1,4            | -          | 3,4      | -                | -             |
| 9    | -              | -          | 2,4      | -                | -             |
| 10   | -              | -          | 0,8      | -                | -             |
| 11   | 2,0            | -          | 2        | -                | -             |
| 12   | 1,6            | -          | -        | -                | -             |
| 13   | -              | -          | 5,6      | -                | -             |
| 14   | -              | -          | 4,3      | -                | -             |
| 15   | -              | -          | 1,8      | -                | -             |
| 16   | -              | -          | -        | -                | -             |
| 17   | -              | -          | 1,0      | -                | -             |
| 18   | -              | -          | 1,6      | -                | -             |
| 19   | -              | -          | -        | -                | -             |
| 20   | -              | -          | 0,9      | -                | -             |
| 21   | -              | -          | -        | -                | -             |

<sup>a</sup>, no manifiesta actividad antimicrobiana.

Tabla 2. Capacidad antimicrobiana de mieles de la Maragateria, provincia de León (España) frente a distintos microorganismos patógenos de interés, expresada en cm<sup>2</sup>.

| Miel | E.coli         | Salmonella | S.aureus | L. monocytogenes | C. sporogenes |
|------|----------------|------------|----------|------------------|---------------|
| 22   | - <sup>a</sup> | 2,4        | 3,6      | -                | -             |
| 23   | -              | 1,8        | 5,5      | 3,6              | -             |
| 24   | -              | 0,7        | 1,9      | -                | -             |
| 25   | -              | 1,3        | 2,2      | -                | -             |
| 26   | -              | 1,0        | -        | -                | -             |
| 27   | -              | 4,2        | -        | 2,2              | -             |

<sup>a</sup>, no manifiesta actividad antimicrobiana.

Foto 2. Placa de Petri con agar Muller Hinton inoculada con *L. monocytogenes*. La muestra de miel número 12 sin diluir (Chaco) presenta una inhibición total frente *Listeria monocytogenes*.



Foto 3. Placas de Muller Hinton inoculada con *Staphylococcus aureus* con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (izquierda) y placa con distintas mieles diluidas al 25%, p/v (derecha).



## OBJETIVO

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de mieles procedentes de la provincia de Chaco (Argentina) y de la comarca de la Maragateria (provincia de León España)

## MATERIAL Y METODOS

### Muestras de miel.

Se analizaron 21 muestras de mieles de la provincia de Chaco (Argentina) y 6 muestras de miel de la comarca de la Maragateria (León, España) en su presentación comercial.

### Microorganismos de ensayo

*Staphylococcus aureus* (aislamiento propio del ICTAL, cepa productor a de enterotoxina B).

*Escherichia coli* (aislamiento propio del ICTAL)

*Salmonella enteritidis* (CECT 704)

*Listeria monocytogenes* (CECT 4032)

*Clostridium sporogenes* (CECT 892, cepa no toxigénica con una similitud genética del 99,7% en la secuencia del rARN del grupo I de *C. Botulinum*).

### Determinación de la capacidad antimicrobiana

**Primer ensayo.** Método de difusión en Agar Muller Hinton (Oxoid) según Murray y Zeiting (1983). Se ajustó el inóculo de cada uno de los microorganismos del ensayo a una concentración entre 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> ufc/ml en agua de peptona al 0,1%. De la dilución correspondiente se tomó un alícuota con un hisopo estéril, se eliminó el exceso de líquido y se distribuyó en la superficie de placas de Agar Mueller-Hinton de 4 mm de grosor, con miel diluida al 25% (p/v) en agua estéril, colocando una alícuota, por duplicado, de 30 µl sobre un disco estéril (Difco). Se realizó el mismo ensayo con miel sin diluir colocando una punta de espátula directamente sobre el agar inoculado.

**Segundo ensayo.** En placas de agar Muller Hinton inoculadas del mismo modo que en el ensayo anterior se practicaron 6 pocillos en tres direcciones rotando la placa aproximadamente 60° entre cada uno para asegurar una distribución uniforme. A cada pocillo se agregaron 0,50 µl de la solución de miel. Las siembras se realizaron por duplicado, tanto para el microorganismo como para la muestra de miel. Se utilizaron distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (PANREAC) como controles positivos 3, 0,003 y 0,0003% (v/v) Las placas de agar Muller Hinton se incubaron a 37°C/18 horas en aerobiosis en los ensayos con *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis* y *L. monocytogenes*, y en anaerobiosis a 30°C/48 horas para *C. sporogenes*. La actividad antimicrobiana se determinó por estimación de las áreas de inhibición utilizando un planímetro (PLACOM).

Gráfico 1. Capacidad antimicrobiana de las mieles de la provincia de Chaco (Argentina) y Maragateria (provincia de León, España) expresada en cm<sup>2</sup> frente a diferentes microorganismos patógenos.

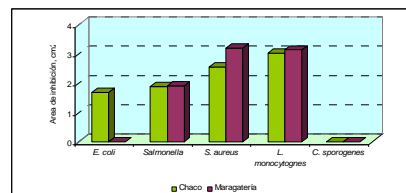
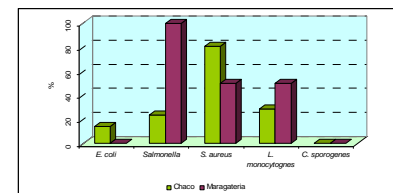


Gráfico 2. Capacidad antimicrobiana (expresada en porcentaje de muestras con poder de inhibición frente a diferentes microorganismos patógenos) de las mieles de la provincia de Chaco (Argentina) y de la Maragateria (provincia de León, España).



Las mieles diluidas (25%, p/v, en agua destilada estéril) tanto de Chaco como de la maragateria no presentaron actividad antimicrobiana. Sin embargo, sí se detectó esta actividad en las mieles sin diluir.

En las mieles sin diluir de la provincia de Chaco, el 80% de las mieles presentaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, el 28,6%, *L. monocytogenes*, el 25%, *S. enteritidis* y el 14% frente a *E. coli*.

Es importante destacar que sólo las muestras de miel de la 1 a la 6, manifestaron efecto de inhibición frente a *Salmonella*, *Listeria* y *S. aureus*. Este hecho pone de manifiesto que la actividad antimicrobiana está ligada al origen floral y geográfico entre otros factores (Allen et al., 1991, Brady et al., 2004; Molan et al., 1988; Price et al., 2006).

Las mieles de la comarca de la Maragateria (León, España) presentaron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* y frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Pero ninguna de las muestras analizadas manifestó efecto inhibitorio frente a *E. coli*. Las mieles maragatas todas procedían de la misma zona geográfica.

Ninguna de las muestras consideradas en este estudio, tanto las de la provincia de Chaco como las de la Maragateria (España), presentaron efecto de inhibición sobre *Clostridium sporogenes*. Y por tanto hemos de entender, inicialmente, que tampoco tendría efecto de control o inhibición sobre *C. botulinum*.

Al igual que han señalado otros investigadores (Taormina et al., 2001; Cooper et al., 2002; Estrada et al., 2005) se ha puesto de manifiesto la sensibilidad de *S. aureus* a las mieles de abeja de nuestro estudio. Este hecho es importante en tanto que *S. aureus* se aísla frecuentemente de heridas infectadas y muchas de sus cepas manifiestan un amplio abanico de resistencia a antibióticos (Ortega-Loayza et al., 2010; Lozano et al., 2011; Spencer et al., 2011)

Destacar la resistencia manifestada por la cepa de *Escherichia coli* con la que hemos trabajado, aunque este hecho también fue puesto de manifiesto por Estrada y colaboradores (2005) en mieles de Costa Rica.

Los resultados obtenidos en esos estudio preliminares, y teniendo en cuenta que algunos de los microorganismos son productores de catalasa (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) y otros no producen catalasa (*Salmonella* y *C. sporogenes*) podemos decir que nos encontramos ante mieles **CON actividad antimicrobiana Peroxido Dependiente** y otras **SIN actividad antimicrobiana Peroxido Dependiente** (Irish et al., 2011) y por tanto sí que deben de existir otros factores de inhibición-control sobre los microorganismos objeto de estudio que deberían ser investigados y caracterizados.

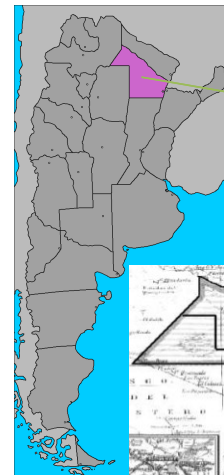
## CONCLUSIONES

**Primera.** Las mieles de la provincia de Chaco, aunque con importantes variaciones dependiendo de la zona geográfica de procedencia y su origen floral, presentaron mayora actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Y en menor medida frente a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

**Segunda.** Las mieles de la Maragateria de la provincia de León (España) presentaron una mayor actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* y *Listeria*.



La MARAGATERÍA es una comarca de la provincia de León (comunidad autónoma de Castilla y León, España) que reúne varias subcomarcas que son la Alta y la Baja Maragateria y dentro de éstas está la vieja zona de la Somaza. Está constituida por 7 municipios y el más importante es Astorga es un municipio y ciudad española situada en la zona central de la provincia de León, en el tránsito entre el Páramo y los montes de León



El Chaco es una provincia del Norte de la República Argentina. La provincia está dividida en seis (6) zonas apícolas, como se muestra en el mapa de abajo. Las 21 muestras analizadas provienen de la Zona 1: muestras de la número 1 a la 3; Zona 2: muestras de la número 4 a la 6; Zona 3: muestra 7; Zona 4: muestras de la número 8 a la 11; Zona 5: muestras de la número 12 a la 13 y Zona 6: muestras de la número 14 a la 21.

Foto 1. Planímetro PLACOM utilizado para medir el área de inhibición.

