

## **COMPORTAMIENTO BACTERICIDA DE MIELES DE *Apis mellifera* Y *Tetragonisca angustula***

### **BACTERICIDAL BEHAVIOR OF HONEY FROM *Apis mellifera* & *Tetragonisca angustula***

Gamboa Abril, M. Viviana.a, Figueroa Ramírez, Judith.b,

a. Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. [mvgamboaa@unal.edu.co](mailto:mvgamboaa@unal.edu.co)

b. Docente, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, [jfigueroaa@unal.edu.co](mailto:jfigueroaa@unal.edu.co)

Universidad Nacional de Colombia, Kra. 30 No. 45- 03, Bogotá, Colombia. Tel: 3165000 Ext: 15317-15318. Fax: 3165401. Diciembre, 2008. [www.unal.edu.co](http://www.unal.edu.co)

#### **Resumen**

El comportamiento bactericida de las mieles de las especies de abejas *Apis mellifera* (A.m) y *Tetragonisca angustula* (T.a) fué evaluado y comparado luego de aplicar la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI) a 94 muestras de miel, de las cuales 50 correspondieron a la especie A.m y 44 a T.a.

Para el caso de las mieles de T.a se evaluaron concentraciones de miel desde un 90% hasta un 5.6%, en 5 microdiluciones 1:1, mientras que mieles de A.m, se evaluaron desde un 80% hasta un 5%. La actividad, se detecto por subcultivos incubados a 24h sobre agar Mueller Hinton

Se utilizaron cepas bacterianas de referencia ATCC, del grupo Gram negativo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028; *Escherichia coli*, ATCC 31617 y *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *pneumoniae*, ATCC 700603 y del grupo Gram positivo *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341.

Los resultados fueron evaluados por distribución binomial con probabilidades de 0 a 1, para lo cual se observó que las cepas bacterianas altamente sensibles al comportamiento bactericida de las mieles de A.m fueron *Micrococcus*, *Klebsiella* y *B. subtilis*, excepto para concentraciones de 5% de miel.

Por otro lado T. *angustula* exhibe acción bactericida significativa sobre *Micrococcus* y *E.coli* en todas las concentraciones y sobre *Klebsiella* y *Salmonella* solo en concentraciones de 90, 45 y 22.3% de miel

La resistencia de *S. aureus* se hizo evidente para mieles de ambas especies con probabilidades por debajo de 0.22.

Palabras clave: Antibacteriano, miel, *Tetragonisca angustula*, *Apis mellifera*, CMI.

## Abstract

The bactericidal behavior of honey from *Apis mellifera* (Am) and *Tetragonisca angustula* (Ta) was evaluated and compared after applying the technique of minimum inhibitory concentration (MIC) to 94 honey samples, 50 of them corresponded to Am and 44 to Ta.

In the case of honey from T. a, the honey concentrations were evaluated from 90% to 5.6% in 5 micro dilutions 1:1, while honey from Am, was evaluated from 80% to 5%. The activity was detected by subcultures incubated for 24h on Mueller Hinton agar. The ATCC reference strains of bacteria used were from the Gram-negative group, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028, *Escherichia coli*, ATCC 31617, and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 and from the Gram positive group *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341.

The results were evaluated by binomial distribution with probabilities of 0 to 1, which showed that bacterial strains highly sensitive to the bactericidal behavior from Am honeys in the case of *Micrococcus*, *Klebsiella* and *B. subtilis*, except for concentrations of 5% honey.

Furthermore *T. angustula* exhibits significant bactericidal action on *Micrococcus* and *E. coli* at all concentrations and over *Klebsiella*, and *Salmonella* only at honey concentrations of 90, 45 and 22.3%.

The resistance of *S. aureus* was evident for both species of honey with probabilities below 0.22.

Keywords: Antibacterials, honey, *Tetragonisca angustula*, *Apis mellifera*, CMI.

## Introducción

Las preferencias de fuentes florales de las especies de abejas *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*, son abundantes y diferenciables, por lo cual se reconoce la amplitud de vegetación que en complemento visitan estas abejas, logrando un aporte especial entre planta y abeja de componentes en la miel que finalmente dan características y/o propiedades como aquellas medicinales, señaladas por productores y consumidores de éste producto. [3].

Asumiendo la popularidad de éstas propiedades; los investigadores han dado rienda suelta a pruebas que se aproximan a la certeza de éstas exclamaciones, a partir de evaluaciones en actividades más concretas como la actividad antimicrobial; actividad que en Colombia se ha resaltado en la miel de abeja angelita y en mieles de abejas de la especie *Apis mellifera* en evaluaciones realizadas para muestras del departamento del Huila [10].

Tradicionalmente en Colombia el uso de mieles de *Apis mellifera* es, edulcorante, antrigripal, etc., que en comparación con la miel angelita más que de consumo tiene un uso medicinal; un ejemplo de ello es la utilización de gotas de miel en enfermedades

oculares.

Así teniendo conocimiento de los posibles usos y propiedades, existe un gran interés de estimar el poder bactericida de las mieles de éstas especies, por lo cual se realiza el siguiente estudio in vitro con la técnica CMI, que determina concentraciones de una sustancia en actividad antibacterial.

## **Materiales y Métodos**

Se realizó un muestreo a nivel nacional a partir de 2006 hasta el presente año de 50 mieles de la especie *Apis mellifera* y 44 mieles de la especie *Tetragonisca angustula*, a las cuales se les aplicó la prueba CMI en microdilución, determinando concentraciones mayores para mieles de T.a por tener una fácil manipulación para éste tipo de evaluación gracias a su baja densidad, mientras que para mieles de A.m se utilizaron menores concentraciones en cada microdilución, por su alta densidad. Así las concentraciones determinadas para cada especie fueron:

<b>Especie</b>	<b>Concentración de miel</b>				
<i>Apis mellifera</i>	80%	40%	20%	10%	5%
<i>Tetragonisca angustula</i>	90%	45%	22.5%	11.25 %	5.625 %

(Técnica de Concentración Mínima Inhibitoria)

Para comprobar la susceptibilidad antibacterial de cada concentración de miel, se realizaron las respectivas diluciones con caldo Mueller Hinton en microplacas de 96 pozos; en las cuales se colocaron en concentración 0.5 MacFarland, las diferentes bacterias correspondientes a las cepas Gram negativas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028; *Escherichia coli*, ATCC 31617 y *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *pneumoniae*, ATCC 700603 y Gram positivas *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* Kocuria *rhizophila*, ATCC 9341. Como base de certeza del experimento se utilizaron dos controles para cada evaluación de cada muestra, estos eran la viabilidad de la cepa bacteriana y el medio de dilución como control negativo.

Para la comprobación visual del efecto bactericida de la miel o del crecimiento de la cepa bacteriana, luego de la incubación de las microplacas, se realizaron subcultivos de cada pozo a agar Mueller Hinton, que fueron igualmente incubados a 37°C por 24 horas.

(Distribución Binomial)

La prueba empleada para análisis de los resultados, devuelve la probabilidad de una variable aleatoria discreta, determinando para el presente estudio, las probabilidades de éxito (efecto bactericida) y fracaso (crecimiento de la bacteria).

## **Resultados y Discusión**

Con la prueba de distribución binomial se obtuvo una probabilidad de acción bactericida bajo cada dilución; siendo altamente significativa en concentraciones de miel A.m de 90 y 40% frente a todas las cepas bacterianas, excepto contra la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, como lo muestra la tabla no 1.

La efectividad de las mieles de A.m, resulta vulnerable en el caso de atacar a *Staphylococcus aureus* y en concentraciones del 5% contra las cepas evaluadas.

Tabla no. 1 Probabilidades de distribución binomial de la acción bactericida de mieles de *Apis mellifera* (A.m)

Cepa bacteriana	Concentración de la miel				
	80%	40%	20%	10%	5%
	P(x)				
<i>Escherichia coli</i>	1	0,984	0,839	0,336	6E-07
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	0,992	0,941	0,032
<i>Salmonella enterica</i>	1	1	0,839	0,76	1E-05
<i>Bacillus Subtilis</i>	1	0,999	0,984	0,999	0,336
<i>Micrococcus luteus</i>	1	1	1	0,999	0,003
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,001	5E-04	2E-04	1E-05	2E-10

Ubicando los ítems evaluados de la tabla no. 1 de mayores a menores probabilidades de efecto bactericida, *Micrococcus luteus* es la cepa con las mejores probabilidades, éstas son de 1; seguida por *Klebsiella pneumoniae* que junto con *Bacillus subtilis* poseen probabilidades cercanas y altas de ser atacadas por la miel de ésta especie. En el medio estarían las cepas de *Salmonella enterica* y *E. coli* quienes son sensibles, principalmente a concentraciones de 80, 40 y 20% de miel. En la última posición se encuentra *Staphylococcus aureus* con p(x) por debajo de 0.001. [Tabla 1]

*Micrococcus luteus* y *E. coli* presentan la mayor sensibilidad a la miel de *Tetragonisca angustula* con p(x) = 1 en concentraciones de 90, 45 y 22.5% de miel, que para las siguientes diluciones, en el caso de *Micrococcus*, se reduce muy poco la significancia de la acción de la miel, mientras que en el caso de *E.coli*, se pierde casi un 50% de p(x), esto es en concentraciones del 11.3 y 5.6%.

La eficacia de la miel de T.a, contra *Klebsiella* se mantiene en cada dilución con un p(x) = 0.91, con una cadencia a un p(x) = 0.85 para la dilución intermedia equivalente al 22.5%. [Tabla 2]

La actividad observada en Salmonella es representativa para las tres concentraciones más altas de miel de T.a y no significativa para una concentración del 5.6% como sucede con 4 de 6 de las cepas bacterianas en ésta concentración, donde se presenta un rango de probabilidad entre 1E-05 y 0.33.

Tabla no. 2 de probabilidades binomiales de la acción bactericida de mieles de Tetragonisca angustula

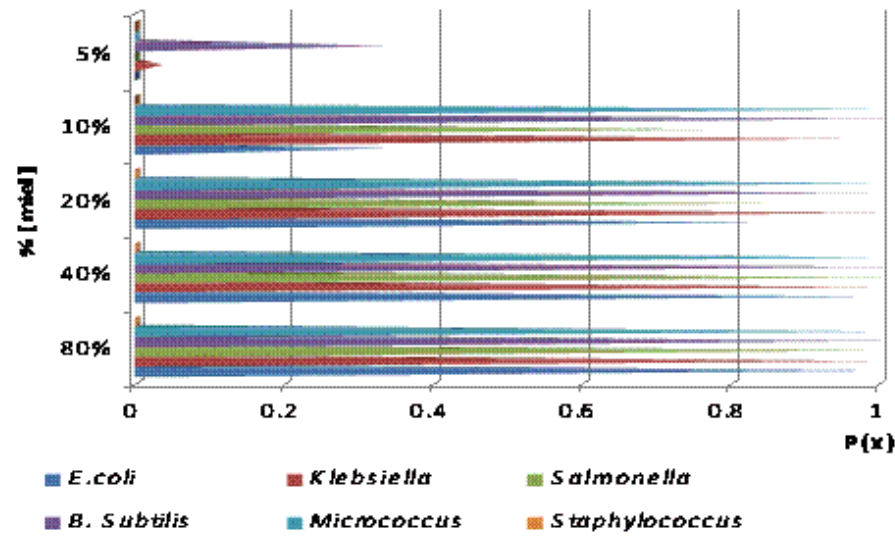
Cepa bacteriana	Concentración de la miel					
	$n$	90 %	45 %	22.5 %	11.3 %	5.6 %
	P(x)					
<i>Escherichia coli</i>	$\frac{4}{4}$	1	1	1	0,44	$\frac{0,32}{6}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$\frac{4}{4}$	$\frac{0,91}{3}$	$\frac{0,91}{3}$	$\frac{0,85}{4}$	$\frac{0,91}{3}$	$\frac{0,91}{3}$
<i>Salmonella enterica</i>	$\frac{4}{3}$	1	$\frac{0,99}{3}$	$\frac{0,88}{9}$	0,38	1E-03
<i>Bacillus Subtilis</i>	$\frac{4}{1}$	$\frac{0,62}{2}$	0,5	$\frac{0,17}{4}$	$\frac{0,37}{8}$	$\frac{0,26}{6}$
<i>Micrococcus luteus</i>	$\frac{4}{3}$	1	1	1	$\frac{0,98}{4}$	$\frac{0,96}{7}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\frac{4}{4}$	$\frac{0,22}{6}$	$\frac{0,04}{8}$	$\frac{0,00}{2}$	$\frac{0,00}{5}$	1E-05

La actividad de menor significancia para cualquier concentración de la miel de angelita, esta representada contra la bacteria Staphylococcus aureus. [Tabla 2]

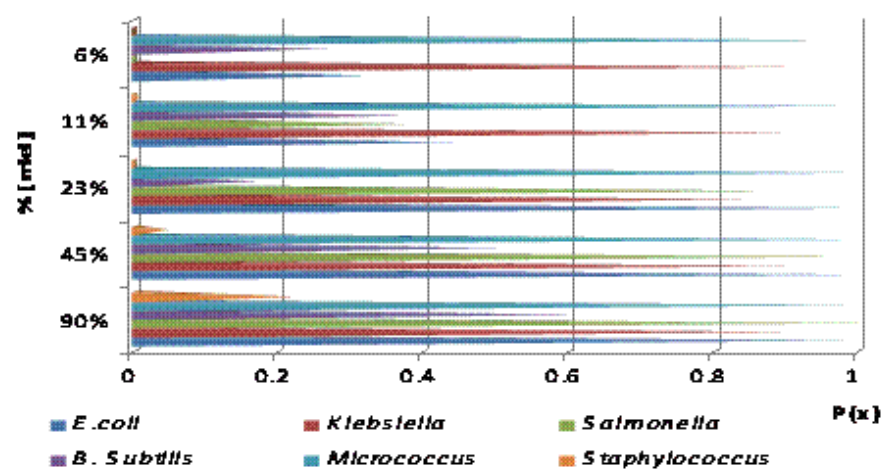
Aún cuando las mieles de la especie Apis mellifera se encuentran más diluidas que las de la especie Tetragonisca angustula, la eficiencia inhibitoria tiene mayores probabilidades en diferentes concentraciones, en caso de atacar a especies bacterianas como Micrococcus luteus, Salmonella enterica, Klebsiella pneumoniae y Bacillus subtilis, sin embargo para concentraciones de miel de A.m al 5% no se presentan eficiencias significativas con p(x) entre = 0.003 y 0.34, como sucede con miel de T.a, donde a una concentración del 5.6% posee aún un p(x) de 0.97 y 0.91 contra Micrococcus y Klebsiella respectivamente. [Tabla 1,2]

E.coli y Staphylococcus aureus demuestran ser más susceptibles a la presencia de mieles de Tetragonisca angustula, en comparación con mieles de Apis melifera; no obstante las probabilidades observadas en S. aureus no son significativas al estar por debajo de 0.23, mientras que las probabilidades de inhibir a E.coli con mieles de T.a, al menos para las tres primeras diluciones, es de un ciento por ciento, es decir que presentan un p(x) = 1. [Tabla 1,2]

**Gráfico de probabilidades binomiales de la acción bactericida de las mieles de Apis mellifera sobre 6 cepas bacterianas**



**Gráfico de probabilidades binomiales de la acción bactericida de las mieles de Tetragonisca angustula sobre 6 cepas bacterianas**



Como se observa claramente en los gráficos, las probabilidades de actividad bactericida para la mayoría de bacterias, son mas altas para el caso de su evaluación bajo las mieles de A.m que T.a, sin embargo en la dilución más alta A.m solo ataca en menor medida a la cepa de B. subtilis, en tanto T.a presenta  $p(x) > 0.8$  con las bacterias Micrococcus luteus y Klebsiella y se mantiene en bajas probabilidades con B. subtilis y E.col. Estos resultados indican el comportamiento bactericida para A.m en concentraciones superiores al 5 % para cuatro de las cepas bacterianas, superiores al 10% para E.coli y en cualquier concentración resulta ser casi nulo para S. aureus. Una de las causalidades de este comportamiento de A.m que resalta sobre las mieles de T.a, puede ser una mayor densidad de azúcares, al igual que las fuentes florares que visitan ya que ambas especies tienen fuentes particulares para su sostenimiento.

## Conclusiones

Las cepas bacterianas que resultaron altamente sensibles al comportamiento bactericida de las mieles de *A. mellifera* fueron *Micrococcus*, *Klebsiella* y *B. subtilis*, excepto para concentraciones de miel del 5%.

Por otro lado *T. angustula* exhibe acción bactericida significativa sobre *Micrococcus* y *E.coli* en todas las concentraciones y sobre *Klebsiella* y *Salmonella* solo en concentraciones de 90, 45 y 22.3% de miel.

La resistencia de *S. aureus* se hizo evidente en evaluaciones con mieles de ambas especies de abejas con probabilidades por debajo de 0.22.

### **Agradecimientos.**

A la Universidad Nacional de Colombia, al ministerio de agricultura y desarrollo rural, a los meliponicultores colombianos, al laboratorio de abejas de la Universidad Nacional de Colombia (LABUN), a sus integrantes y a la dirección, al laboratorio de microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia y sus integrantes y al estadístico Víctor Solarte.

### **Bibliografía**

1. AOAC International Antibiotics in feeds, microbiological methods. Gaithersburg, MD:AOAC International; AOAC "Official Methods of Analysis of the AOAC International" 957.23.
2. Cabrera L; Céspedes E; Nava R. y Ojeda G. Actividad Antibacteriana No-Peróxido de Miel Zulianas. RC v.16 n.5 Maracaibo out. 2006
3. Cepeda M., Nates G. Téllez G. Comercialización de los productos de la meliponicultura en Colombia. Memorias, V Congreso Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Mérida, México. Octubre 2008
4. Estrada H; Gamboa M; Chaves C; Arias M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*: evaluación de su carga microbiológica. Arch. latinoam. nutr;55(2):167-171, jun. 2005. tab.
5. Cruzado R; Gutiérrez C; Ruiz R. Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos. Rev. Med. Vallejiana vol.4 no.2 Lima 2007.
6. Domenico P, Salo R J, Cross A S, and Cunha B A. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity, October 1994, p. 4495-4499, vol. 62 No. 100019-9567/1994.
7. Gamboa V; Figueroa J; Nates P; Cepeda M; Rosso J. Determinación del poder antibacterial de mieles de abejas nativas sin aguijón, a partir de la concentración mínima inhibitoria. Memorias V Congreso Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Mérida, México. Octubre 2008
8. Garedew A., Schmolz E., Lamprecht I., Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. *Thermochimica acta* ISSN 0040 - 6031 Coden Thacas. Allemagne (19/03/2003)
9. Journal of Applied Microbiology., The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds 2002

10. Noval D; Ortiz A; Nivia M; Figueroa J. Determinación del poder antibacteriano de mieles del Huila. Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad Nacional de Colombia. 2006.
11. Rasheed JK, et al. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2382-2388, 2000. PubMed: 10952583
12. Sekowska A, Janicka G, Klyszejko C, Wojda M, Wróblewski M, Szymankiewicz M. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics.
13. U.S. Pharmacopeia General Chapters; <81> ANTIBIOTICS-MICROBIAL ASSAYS. Rockville, MD:U.S. Pharmacopeia; USP USP28-NF23, 2005
14. U.S. Food & Drug Administration Inhibitory substances in milk, *Sarcina lutea* cylinder plate method In: U.S. Food & Drug Administration Bacteriological analytical manual 8th ed. Gaithersburg, MDAOAC International pp. 20.01-20.04, 1995