

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA NO-PERÓXIDO DE MIELES ZULIANAS

Non-Peroxide Antibacterial Activity in Zulia Honey

Lilibeth Cabrera, Euclimar Céspedes, Rosa Nava y Graciela Ojeda de Rodríguez*

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia.
Apartado postal 526, Maracaibo, Venezuela. E-mail: grodriguez@intercable.net.ve

RESUMEN

La actividad antibacteriana no-peróxida de la miel de abeja se evaluó en 160 muestras procedentes de cuatro centros apícolas del estado Zulia: Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, La Rinconada, Mara y Caja Seca, durante la época seca y lluviosa. Se muestrearon 20 panales obteniéndose 20 litros de miel por zona/época, llevando a cabo diluciones de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 y 5% (p/v) de concentración de miel utilizando como diluyente catalasa al 0,2% (p/v). Las muestras se analizaron utilizando cepas patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Proteus mirabilis*, mediante la técnica de difusión en agar. Los resultados obtenidos revelaron que las mieles zulianas, tuvieron actividad antibacteriana del tipo bacteriostático contra las seis bacterias seleccionadas. La bacteria más susceptible fue *Pseudomonas aeruginosa*, a nivel de todas las concentraciones ensayadas.

Palabras clave: Actividad antibacteriana no-peróxido, miel de abejas, técnica de difusión en agar.

ABSTRACT

The honey bee non peroxide antibacterial activity was evaluated in 160 samples from four zones of the Zulia state: The Agronomy Faculty of the University of Zulia, La Rinconada, Mara and Caja Seca during the dry and rainy seasons. Twenty honey combs per zone and per season were sampled, obtaining 20 L of honey for test, making dilutions from 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 to 50% (% w/v) of honey content using 0.2% (w/v) catalasa a diluent. The samples were

analyzed using pathogenic strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* and *Proteus mirabilis*, with the agar diffusion technique. The results obtained showed that the Zulia state honeys had antibacterial activity (bacteriostatics) against the six bacteria selected. The most susceptible bacterium was *Pseudomonas aeruginosa*, over the range of concentrations assayed.

Key words: Non-peroxide activity, honeys, agar diffusion assay.

INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento nutritivo que es consumido por el hombre en todo el mundo debido a sus bondades, en cuanto a su valor nutritivo y a sus efectos terapéuticos. Ha sido considerado un agente antibacteriano efectivo para el tratamiento de infecciones respiratorias, gastrointestinales, úlceras, heridas y quemaduras [3, 12, 13, 24, 29]. Su actividad antimicrobiana la han confirmado numerosos autores, en bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*) [2, 4, 6, 7, 12, 16, 22, 25, 26, 29, 30].

Su notable efecto antiséptico se debe a factores físicos y químicos que pueden estar relacionados con diferentes fuentes florales y abejas de diferentes orígenes [21, 28, 29], donde su viscosidad provee una barrera contra las infecciones, y por otro lado su osmolaridad [10, 31] provoca la salida de líquidos de los tejidos, creando un ambiente húmedo aséptico [13] que inhibe microorganismos patógenos. También puede ser atribuido a la actividad de la lisozima [11], a varios ácidos aromáticos [12, 21], a la acidez [9] y compuestos volátiles [18, 27, 29].

Hay dos fuentes de agentes antibacterianos, aquella que tiene su origen en el peróxido de hidrógeno, producida por la glucosa oxidasa [16] y la debida a componentes diferentes al peróxido de hidrógeno. Son varios los autores [4, 19, 20] que resaltan la actividad antibacteriana no-peróxido como la más importante, debido a que la glucosa oxidasa es inactiva en mieles maduras, el contenido de peróxido de hidrógeno es insuficiente para inhibir el crecimiento bacteriano y además no es sensible a la luz y al calor, y puede almacenarse por largos periodos de tiempo.

El propósito del presente estudio fue evaluar la actividad antibacteriana no-peróxido (efecto bacteriostático y bactericida) de las mieles zulianas contra seis especies bacterianas, las cuales son comúnmente asociadas a infecciones en los humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras de miel

Ciento sesenta muestras de miel de abejas puras multiflorales, se obtuvieron (según un muestreo representativo aleatorio) de apiarios correspondientes a cuatro zonas del estado Zulia: Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia (LUZ) (MI), La Rinconada (MII), Mara (MIII) y Caja Seca (MIV). Se muestreó un apiario por zona/época, tomando 20 litros de miel de dos colmenas, para un total de 20 panales de miel de abeja. La época seca correspondió a los meses: noviembre-abril (Es) y la lluviosa a los meses: mayo-octubre (Ell) del año 2004. Las muestras de miel fueron almacenadas asépticamente en envases de color ámbar a 25°C, hasta el momento de su análisis.

Preparación de las muestras de miel

Soluciones de mieles en concentraciones de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 y 5% (% p/v) fueron preparadas asépticamente y colocadas en frasco ámbar para evitar la fotodegradación de la glucosa oxidasa. La actividad antibacteriana no-peróxido se hizo utilizando soluciones de trabajo de la miel, preparadas con solución de catalasa al 0,2% (p/v) (Sigma C-6665: 4000 unidades/mg de proteína, EUA), para eliminar el peróxido de hidrógeno presente en las muestras de miel de abejas [1].

Cepas bacterianas

Las especies bacterianas usadas en el presente estudio se especifican a continuación: Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* y Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. Estas bacterias fueron obtenidas del Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia (Venezuela) y mantenidas en caldo infusión cerebro corazón (BHI, Merck, Alemania) y almacenadas a 4°C, hasta el momento de su utilización. El inóculo bacteriano fue previamente estandarizado mediante determinación de la den-

sidad óptica (D.O.) de cada cultivo a 550 nm y curvas de crecimiento, siendo éste el correspondiente a $1,5 \times 10^6$ ufc/mL. Para el momento del uso de los cultivos bacterianos, estos fueron activados, cultivándolos por 18 horas a 35°C en BHI [5].

Actividad antibacteriana de la miel

Se hizo utilizando las bacterias Gram positivas y Gram negativas, siguiendo la técnica de difusión en agar en placas, según lo descrito por Allen y col. [1] y Molan y Allen [14], utilizando placas de petri con 18 mL de agar nutritivo (Merck, Alemania) e inoculadas con 100 µL de un cultivo joven (3,5 horas de incubación a 35°C) de cada bacteria. Cada experimento (por zona) se hizo por triplicado, realizando 3 pozos de 8 mm de diámetro, en la placa inoculada con bacteria, utilizando un sacabocado estéril N° 4. A los pozos se le añadió 100 µL de miel no diluida y diluida a las concentraciones antes mencionadas. Las pruebas controles, por experimento, consistieron en una placa con medio y cada cepa analizada, perforada e inoculada con agua destilada, placa con medio y cepas, perforada e inoculada con el solvente (solución de catalasa) y placa con medio sin cepa, perforada e inoculada con miel sin diluir (de cada zona). Las placas fueron invertidas al cabo de 30 min para la difusión de la miel e incubadas a 35°C por 18 horas.

La actividad antibacteriana de las muestras de miel se determinó midiendo el halo de inhibición (opaco o transparente) alrededor de cada pozo, con ayuda de un vernier calliper. Se consideró un resultado positivo cuando hubo halo de inhibición igual o mayor de 2 mm de diámetro alrededor de cada pozo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de las pruebas antibacterianas se hizo empleando un diseño aleatorio con efectos fijos del paquete S.A.S [23], con comparaciones de media a un nivel de significancia de $P < 0,001$. Se tomó en cuenta el efecto de las muestras de miel de las cuatro zonas apícolas por época.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras de miel de abejas, procedentes de los cuatro centros apícolas tratadas con solución de catalasa, tanto diluida como no diluida, mostraron actividad antibacteriana de tipo bacteriostático, indicando que dicha actividad es debida a elementos no-peróxido [10, 11, 12, 18, 21, 25, 27, 31]. Otros investigadores [4, 20] encontraron que la actividad no-peróxido de la miel es una de las más importantes, resulta insensible a la luz y mantiene su actividad por largos periodos de tiempo [4].

En las FIGS. 1 y 2 se observan la actividad antibacteriana debida a elementos no-peróxido de la miel de abejas de MI, durante la ES y ELL, respectivamente. En la FIG. 1 se puede

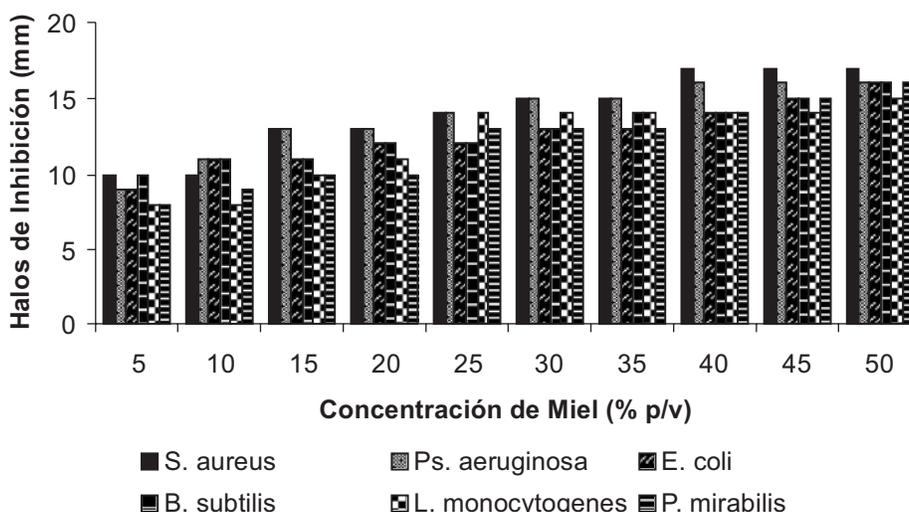


FIGURA 1. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE AGRONOMÍA DE LUZ, EN LA ÉPOCA SECA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE AGRONOMY FACULTY ZONE OF LUZ DURING THE DRY SEASON.

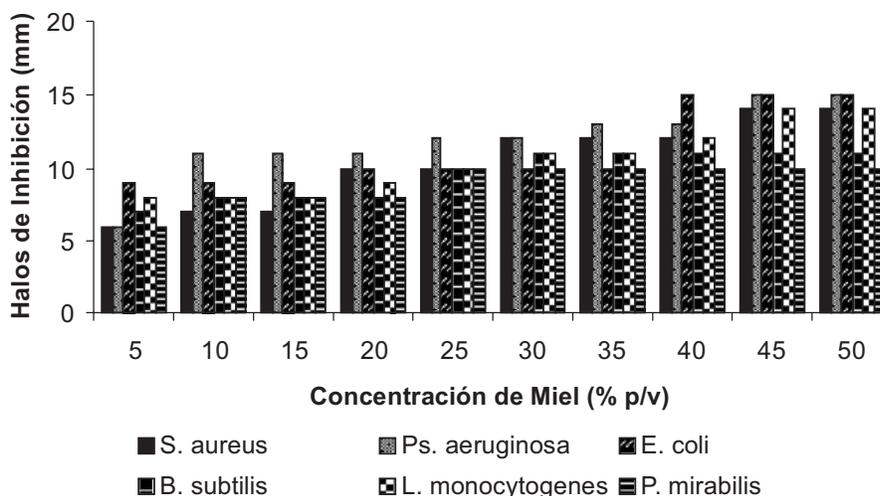


FIGURA 2. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE AGRONOMÍA DE LUZ, EN LA ÉPOCA LLUVIOSA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE AGRONOMY FACULTY ZONE OF LUZ DURING THE RAINY SEASON.

observar que todas las cepas analizadas tanto gram positivas como gram negativas, resultaron inhibidas en su crecimiento a nivel de todas las concentraciones de miel analizadas. Son varios los reportes acerca de la actividad antimicrobiana de miel de abeja (*Apis mellifera*) contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre las que se mencionan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *P. mirabilis* [12, 15, 17]. El mayor halo de inhibición fue de 17 mm y el menor fue de 8 mm, La cepa *S. aureus* fue la que resultó más sensible a dicha miel, presentando halos de inhibición de 17 mm a partir de la concentración del 40% ($P < 0,001$). Resultados similares fueron encontrados por Bogdanov [4], Molan y Allen [14], Molan y Russell [16] y Willix y col. [30], quienes reportaron la acción antibacteriana de la miel de abejas con actividad no-peróxido sobre *S. aureus* a

concentraciones de 1,8% [28] y de 5 a 10% [14]. Cooper y col. [7] en su trabajo demostró susceptibilidad de *S. aureus* a miel de Manuka (2-3% v/v) y de Pasture (3-4% v/v).

Es de resaltar que la acción inhibitoria de la miel con solución de catalasa resultó evidente en *P. aeruginosa*, mientras que por efecto de mieles con peróxido, de esta misma zona (MI), no fue afectada en su crecimiento a nivel de ninguna concentración [5]. Cooper y Molan [6] encontraron sensible cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones de heridas, a concentraciones de 5,5 a 9,0% de miel de Manuka, sin peróxido de hidrógeno.

En la FIG. 2 correspondiente a la ELL, se observa que las bacterias fueron inhibidas a medida que la concentración

de miel aumentaba, y cuando la solución de miel fue más diluida (5%), mantuvo su poder antibacteriano. No obstante, los valores de halos de inhibición resultaron menores (< 15 mm) con respecto a la ES. *P. mirabilis* resultó la menos afectada ($P < 0,001$) con halos de inhibición máximo de 10 mm.

En las FIGS. 3 y 4 se observan la actividad antibacteriana debida a elementos no-peróxido de la miel proveniente de la zona MII, durante la ES y ELL, respectivamente. En la FIG. 3 se observa que la miel de esta zona presenta un comportamiento similar a la miel de la zona MI, es decir, con halos de inhibición que aumentan a medida que se incrementa la concentración de miel. Cabe resaltar que *P. aeruginosa* mostró un comportamiento particular frente a las concentraciones de miel de 5, 10 y 15%, donde presentó un valor constante de halos de inhibición (10 mm) y a partir del 15% se incrementó a

medida que aumentaba la concentración, hasta valores de halos de inhibición de 17 mm. Cabrera y col. [5] encontraron que las mieles de las zonas MI y MII con peróxido, no inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa*.

La FIG. 4 muestra la actividad antibacteriana de MII, durante la ELL, donde todas las bacterias analizadas resultaron inhibidas en su crecimiento a nivel de todas las concentraciones. La cepa mayormente afectada fue *P. aeruginosa* ($P < 0,001$) a 45 y 50% de concentración de miel, mientras que la menos afectadas fueron *P. mirabilis* y *S. aureus* ($P < 0,001$), a nivel de concentraciones de 40 y 45%. En mieles con peróxido [5] dichas bacterias fueron afectadas en menor proporción. Hodgson [8] encontró que *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. mirabilis* resultaron afectadas en su crecimiento por mieles con actividad antibacteriana no-peróxido.

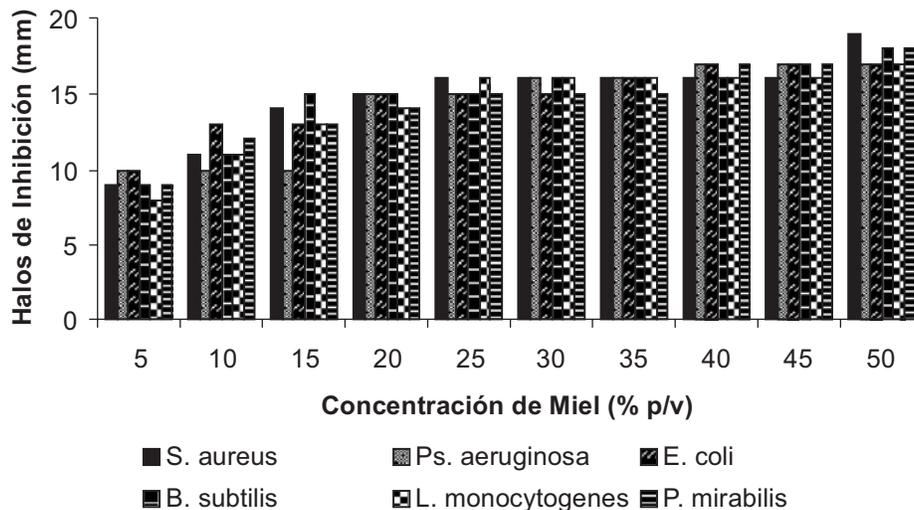


FIGURA 3. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE LA RINCONADA, EN LA ÉPOCA SECA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE RINCONADA ZONE DURING THE DRY SEASON.

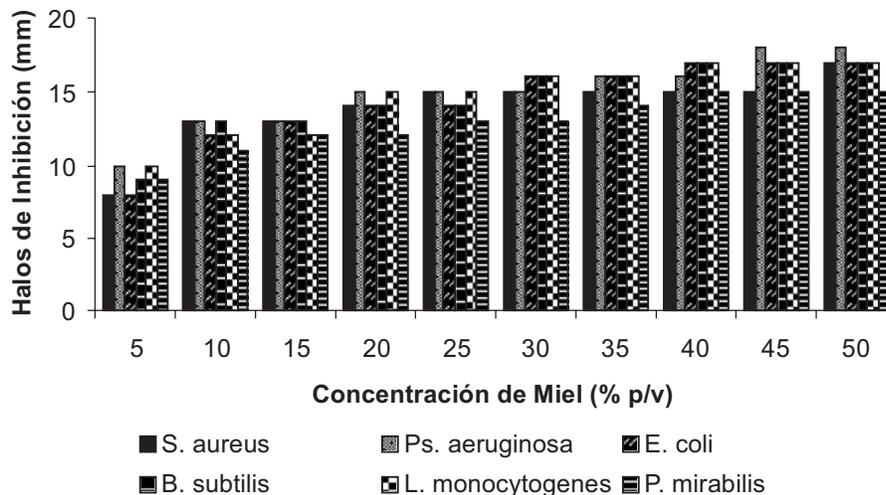


FIGURA 4. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE LA RINCONADA, EN LA ÉPOCA LLUVIOSA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE RINCONADA ZONE DURING THE RAINY SEASON.

Las FIGS. 5 y 6 muestran la actividad antibacteriana de la miel proveniente de la zona MIll, durante las ES y ELL, respectivamente. En la FIG. 5 se observa que todas las bacterias analizadas fueron inhibidas a nivel de todas las concentraciones de miel, donde los halos de inhibición aumentaron proporcionalmente a medida que se concentraba la miel y resultaron a su vez menores en diámetro que lo encontrado con la miel de las zonas MI (ES) y MII (ambas épocas). Las cepas bacterianas más sensibles al efecto inhibitorio fueron *S. aureus* y *P. aeruginosa* a nivel de todas las concentraciones ($P < 0,001$). A la concentración del 50% dichas cepas presentaron los mayores halos de inhibición (15mm). Según Willix y col. [30] *S. aureus* se presenta sensible frente a concentraciones de 1,8 a 10,8% de mieles de Manuka con y sin peróxido. *E. coli* fue la bacteria menos afectada por la miel en concentraciones de 10

a 40%. Estos resultados son diferentes a los reportados por Willix y col. [30], donde dicha bacteria resulta inhibida en su crecimiento por mieles tratadas con catalasa, y similares a los reportados por Cabrera y col. [5].

En la FIG. 6 se observa un comportamiento similar con respecto a la ES, observándose que todas las cepas bacterianas resultaron afectadas en su crecimiento, a nivel de todas las 10 concentraciones. *P. aeruginosa* en este caso se mostró como la cepa más sensible a la miel de abejas, a nivel de las concentraciones de miel de 30 a 40% ($P < 0,001$), mientras que en el trabajo de Cabrera y col. [5] se encontró que dicha bacteria resultó la menos afectada por miel de esta zona.

Willix y col. [30] demostraron la sensibilidad de las cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *E. coli* frente a ele-

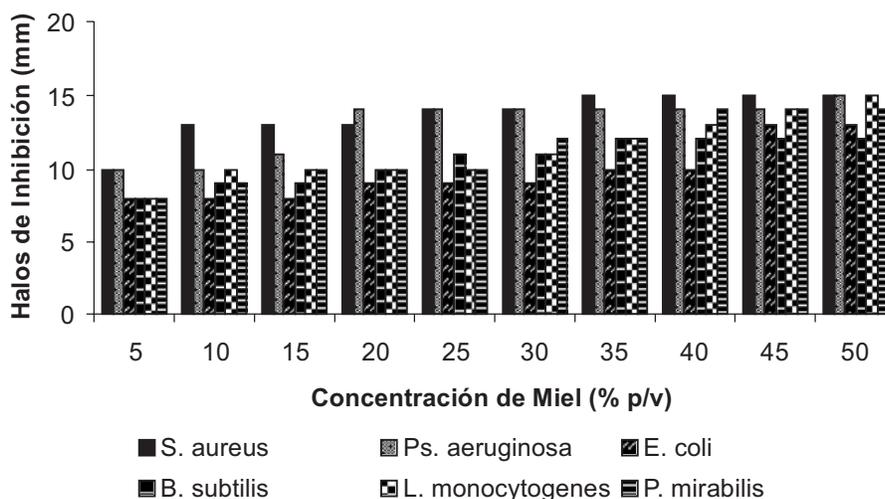


FIGURA 5. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE MARA EN LA ÉPOCA SECA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE MARA ZONE DURING THE DRY SEASON.

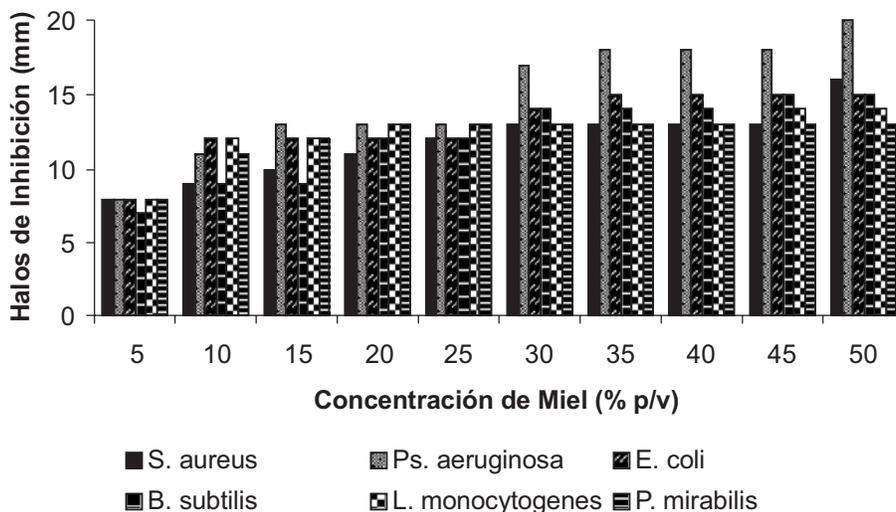


FIGURA 6. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE MARA EN LA ÉPOCA LLUVIOSA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE MARA ZONE DURING THE RAINY SEASON.

mentos no-peróxido de la miel de Manuka aún a concentraciones de 1,1 hasta 7,5%. En el presente trabajo dichas cepas se encontraron inhibidas dentro de este rango.

Las FIGS. 7 y 8 muestran la actividad antibacteriana de miel de abejas de la zona MIV, durante las ES y ELL, respectivamente. En la FIG. 7, se observó una gran variabilidad en cuanto al comportamiento de las 6 cepas bacterianas frente a esta miel, donde el efecto inhibitorio no resultó ser gradual en relación a las concentraciones ensayadas. Entre 5 y 25% de concentración de miel, se observó diferencias significativas ($P < 0,01$) de *P. aeruginosa* con respecto al resto de las bacterias, resultando la mayormente afectada. Estos resultados fueron contrarios a los encontrados por Cabrera y col. [5] en la que sólo resultó inhibida a concentraciones iguales y mayores a 40%. Entre las concentraciones del 30 y 45%, las especies

bacterianas analizadas no mostraron diferencias significativas ($P < 0,01$) en sus halos de inhibición.

En la muestra de miel de abeja de esta zona para la ELL (FIG. 8) se observó que todas las cepas bacterianas se comportaron de manera similar frente a dicha miel, y a diferencia de la época seca los halos de inhibición fueron menores o iguales a 15 mm a las concentraciones de 45 y 50%, mientras que en la ES fueron iguales o menores a 20 mm. *P. aeruginosa* fue la bacteria más susceptible al efecto inhibitorio en ambas épocas, a partir de concentraciones de 15%.

Willix y col. [30] demostraron la baja sensibilidad de *P. aeruginosa* frente a mieles de Manuka y Rewarewa, a concentraciones iguales o menores a 7,4% y Cabrera y col. [5] en mieles zulianas con peróxido, a concentraciones menores de

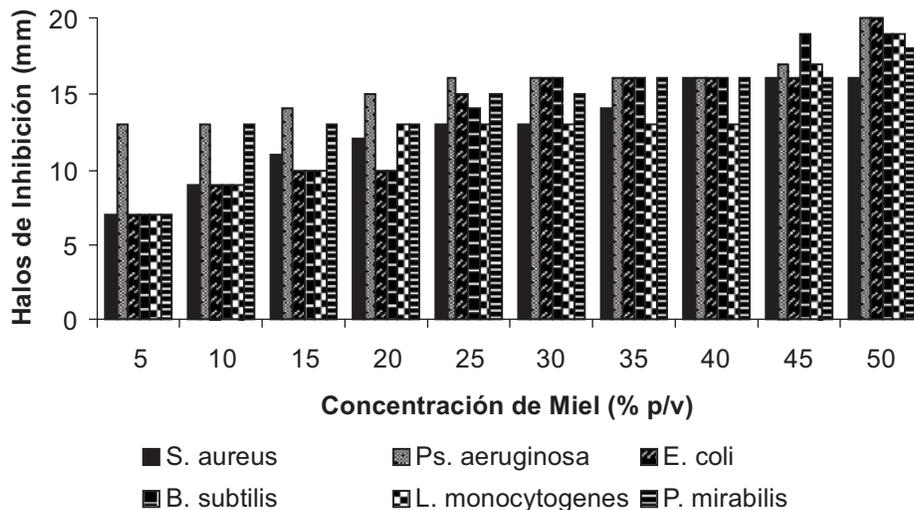


FIGURA 7. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE CAJA SECA EN LA ÉPOCA SECA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE CAJA SECA ZONE DURING THE DRY SEASON.

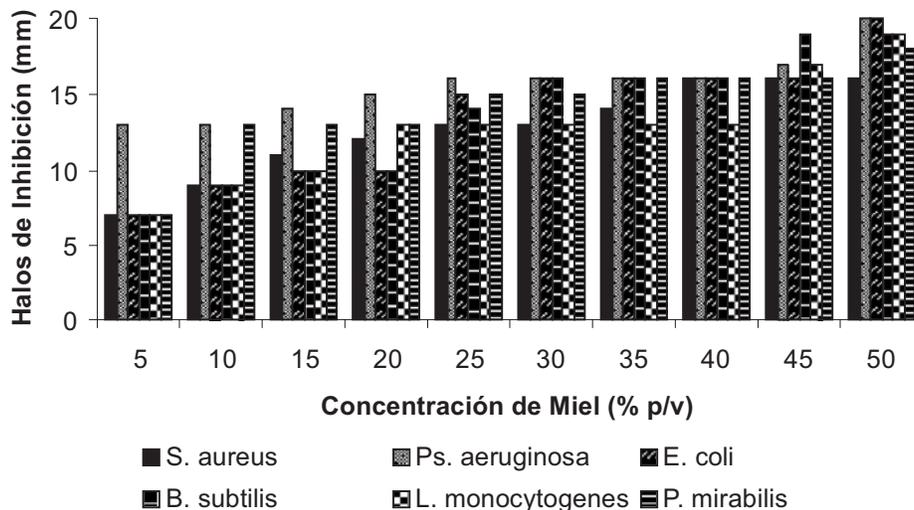


FIGURA 8. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL DILUIDA DE LA ZONA DE CAJA SECA EN LA ÉPOCA LLUVIOSA / VALUES FOR THE BACTERIAL GROWTH INHIBITION HALO (MM) OF SOME DILUTED HONEY SAMPLES FROM THE CAJA SECA ZONE DURING THE RAINY SEASON.

35%. Estos reportes revelaron un comportamiento diferente de la bacteria a lo encontrado en el presente estudio, para las mieles de la zona MIII (ambas épocas).

Estudios realizados por otros investigadores [3, 12, 17] han mostrado que la miel tiene actividad antimicrobiana contra especies como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *E. coli*, inhibiendo el crecimiento total de estas especies, y se le ha reconocido su gran potencial en la reducción de patógenos causantes de infecciones [25]. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en esta investigación. Por otro lado, Allen y col. [1] resalta que mieles de Nueva Zelanda, libres de peróxido de hidrógeno por adición de catalasa, tienen una significativa actividad antibacteriana remanente.

CONCLUSIONES

Las mieles zulianas producidas por las abejas (*Apis mellifera scutellata*) tienen actividad bacteriostática no-peróxido contra las seis bacterias Gram positivas y Gram negativas, de origen clínico evaluadas en este estudio. La bacteria más susceptible fue *Pseudomonas aeruginosa*, a nivel de todas las concentraciones ensayadas. Esto resulta importante en lo que a tratamiento alternativo se refiere, frente a esta bacteria que con frecuencia se encuentra vinculada con cuadros de infecciones intrahospitalarias. Sin embargo, resulta conveniente la evaluación clínica y estandarización farmacológica de la miel antes de su uso, como medida preventiva y curativa de las enfermedades comunes relacionadas con las bacterias patógenas analizadas.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) por el financiamiento que hizo posible la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLEN, K.; MOLAN, P.; REID, G. A survey of the activity of some new Zealand honeys. **J. Pharm. Pharmacol.** 43: 817-822. 1991.
- [2] AI SOMAL, N.; COLEY, K.; MOLAN, P.; HACOOK, B. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. **J. Royal Soc. Med.** 87: 1-3. 1994.
- [3] ANDARGARCHEW, M.; BELAY, T.; FETENE, D. *In vitro* assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. **Ethiop. J. Health Dev.** 18: 107-111. 2004.
- [4] BOGDANOV, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. **Lebensm. Wiss Technol.** 30: 748-753. 1997.
- [5] CABRERA, L.; OJEDA DE R., G.; CÉSPEDES, E.; COLINA, A. Actividad antibacteriana de miel de abejas multiflorales (*Apis mellifera scutellata*) de cuatro zonas apícolas del estado Zulia, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIII (3): 205-211. 2003.
- [6] COOPER, R.; MOLAN, P. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. **J. Wound Care** 8: 161-164. 1999.
- [7] COOPER, R.; MOLAN, P.; HARDING, K. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **J. R. Soc. Med.** 92: 283-285. 1999.
- [8] HODGSON, M. Investigation of the antibacterial action spectrum of some honeys. University of Waicato, Hamilton, New Zealand. (MSc. Thesis). 98 pp. 1989.
- [9] MATO, I.; HUIDOBRO, J.; SÁNCHEZ, M.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. Calculation of different citric acid forms in honey and their relationships with the honey pH. **Deutsche Lebensm.** 96: 177-180. 2000.
- [10] MCCARTHY, J. The antibacterial effects of honey: medical fact or fiction. **Ame. Bee J.** Mayo: 341-343. 1995.
- [11] MOHRIG, W.; MESSNER, R. Lysozym als antibakterielles agens im Honig und Benengift. **Acta Biol. Med. Germ.** 21:85-95. 1968.
- [12] MOLAN, P. The antibacterial activity of honey. **Bee World** 73: 5-28. 1992.
- [13] MOLAN, P. C. Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. **Bee World** 82: 22-40. 2001.
- [14] MOLAN, P.; ALLEN, K. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. **J. Pharm. Pharmacol.** 48: 1206-1209. 1996.
- [15] MOLAN, P.; BETTS, J. Using honey dressings: the practical considerations. **Nurs Times** 96: 36-37. 2000.
- [16] MOLAN, P.; RUSSELL, K. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. **J. Agric. Res.** 27: 62-67. 1988.
- [17] NZEAKO, L.; HAMDY, J. Antimicrobial potential of honey. **Med. Sci.** 2: 75-79. 2000.
- [18] OBAEISEKI-EBOR, E.; AFONOYA, T.; ONYEKWELI, A. Preliminary reports on the antimicrobial activity of honey distillate. **J. Pharm. Pharmacol.** 35: 748-749. 1983.
- [19] RADWAN, S.; EL-ESSAWY, A.; SARHAN, M. Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against micro-organisms. **Zentralblatt Für Mikrobiol.** 139: 249-255. 1984.
- [20] ROTH, L.; KWAN, S.; SPORNS, P. Use of a disc assay to detect oxytetracycline residues of honey. **J. Food Prot.** 49: 436-444. 1986.

- [21] RUSSEL, K.; MOLAN, P.; WILKINS, A.; HOLLAND, P. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey. **J. Agric. Food Chem.** 38: 10-13. 1988.
- [22] SELÇUK, H.; NEVIN, K. Investigation of antimicrobial effect of honey collected from various regions of Turkey. **Pakistan J. Biol. Sci.** 5: 325-328. 2002.
- [23] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (S.A.S.) **Users Guide Statistics.** Cary, NC. Version 5,0. 1985.
- [24] SUBRAHMANYAM, M. Topical application of honey treatment of burns. **British J. Surg.** 78: 497-498. 1991.
- [25] TAORMINA, P.; NIEMIRA, B.; BEUCHAT, L. Inhibitory activity of honey against food borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **Intern. J. Food Microbiol.** 69: 217-225. 2001.
- [26] TORRES, A.; GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigation properties of "Angelita" honey-a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. **Thermoch. Acta** 415: 107-113. 2004.
- [27] TOTH, G.; LEMBERKOVICS, E.; KUTASI-SZABO. The volatile components of some Hungarian honeys and their antimicrobial effects. **Ame. Bee J.** 127: 496-497. 1987.
- [28] WESTON, R. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. **Food Chem.** 71: 235-239. 2000.
- [29] WESTON, R.; MICHELL, K.; ALLEN, K. Antibacterial fenolic components of New Zealand Manuka honey. **Food Chem.** 64: 295-301. 2000.
- [30] WILLIX, D.; MOLAN, P.; HARFOOT, C. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of Manuka honey and other honey. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 388-394. 1992.
- [31] YATSUNAMI, K.; ECHIGO, T. Antibacterial activity of honey and royal jelly. **Honey Bee Sci.** 5: 125-130. 1984.