

Actividad antibacteriana de la miel tabasqueña contra *Staphylococcus saprophyticus*

H. L. Arias-de la Cruz¹

G. F. Álvarez-Sánchez^{2*}

J. M. Zaldívar Cruz^{3*}

A. G. Nila Méndez⁴

E. Hernández Domínguez⁴

Abstract:

Inappropriate use of antibiotics to treat bacterial infections has generated many forms of resistance, including *Staphylococcus saprophyticus*, a common contaminant in meat and fermented foods, responsible for gastrointestinal and urinary tract infections. To solve this problem, research has been carried out on alternative therapies, such as apitherapy. Therefore, the aim of this study was to determine the antibacterial properties of Tabasco honeys against *S. saprophyticus*. This research was carried out at the Plant Biotechnology Research Unit (UNIBVE) of the “Instituto Tecnológico Superior de Acayucan (ITSA)”. Ten honey samples were collected from different apiaries in the state of Tabasco. The tests were performed by the agar diffusion and broth dilution method using honey dilutions at 75, 37.50, 18.75, 9.38 and 4.69 % (v/v). *S. saprophyticus* was inoculated in sterile nutrient broth and growth kinetics were determined by spectrophotometry to identify the early stationary phase (0.6 OD). The best results were detected in samples 3 and 5 (Huimanguillo Tabasco) with a MIC of 9.38%. The results show that Tabasco honeys have internationally comparable antibacterial effects, therefore further studies are needed and the sampling area extended to identify other honeys with the same potential, as well as to identify the floral sources that provide these characteristics.

Keywords: MBC, MIC, broth dilution, agar diffusion.

¹División de ciencias básicas e ingeniería, Universidad Popular de la Chontalpa.

²Facultad Maya de Estudios Agropecuarios, Universidad Autónoma de Chiapas.

³Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

⁴Tecnológico Nacional de México/ITS Acayucan.

*Autores de correspondencia
G. F. Álvarez-Sánchez
geiner.alvarez@unach.mx
J. M. Zaldívar Cruz
zaldivar@colpos.mx

[Tel. 9371387626/9371414109](tel:9371387626/9371414109)

Resumen

El uso inapropiado de antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas ha dado lugar a muchas formas de resistencia, como es el caso de *Staphylococcus saprophyticus*, un contaminante frecuente en la carne y alimentos fermentados, responsable de infecciones gastrointestinal y del tracto urinario. Para abordar esta problemática se han realizado investigaciones sobre terapias alternativas, como es el caso de la apiterapia. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar las propiedades antibacterianas de las mieles tabasqueñas contra *S. saprophyticus*. Esta investigación se realizó en la Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal (UNIBVE) del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan (ITSA). Para ello, se colectaron 10 muestras de miel de diferentes apiarios del estado de Tabasco. La cepa pura de *S. saprophyticus* se inoculó en caldo nutritivo y se determinó la cinética de crecimiento mediante espectrofotometría para identificar la fase estacionaria temprana (0.6 OD). Los ensayos de CMI y CMB se desarrollaron por el método de difusión en agar y dilución en caldo usando diluciones de miel a 75, 37.50, 18.75, 9.38 y 4.69 % (v/v). Los mejores resultados se detectaron en las muestras 3 y 5, que pertenecen al municipio de Huimanguillo, donde se obtuvo una CMI de 9.38%. Estos resultados demuestran que las mieles tabasqueñas poseen efectos antibacterianos comparables a otras mieles

de nivel internacional. Suponemos que más mieles de estas zonas potencialmente podrían exhibir esta capacidad antibacteriana por las características botánicas.

Palabras clave: CMB, CMI, Dilución en caldo, Difusión en agar

Introducción

El uso indiscriminado de los antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas ha dado lugar a muchas formas de resistencia (Fyfe *et al.*, 2017), incluidas las cefalosporinas, las fluoroquinolonas y la trimetoprima-sulfametoxazol, limitando su uso para el tratamiento de infecciones urinarias (Arends *et al.*, 2023). Lo que ha provocado el desarrollo de alternativas para contrarrestar el efecto de bacterias resistentes, como el uso de la proteómica sustractiva y comparativa para la identificación y predicción de objetivos farmacológicos (Shahid *et al.*, 2020), el uso de nuevos antibióticos (Arends *et al.*, 2023) o alternativas naturales como uso de la miel de abeja (Boussaid *et al.*, 2018; Velásquez *et al.*, 2020; Mustafa *et al.*, 2022).

El uso de la miel ha llamado la atención debido al potencial antibacteriano que posee, como es el caso de la miel de Ulmo (*Eucryphia cordifolia*) capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa* y cepas de *S. aureus*-MRSA, su actividad se atribuye principalmente a los compuestos fenólicos (Velásquez *et al.*, 2020).

Por otro lado, las mieles de Peumo (*Cryptocarya alba*) y Quillay (*Quillaja saponaria*) son capaces de eliminar a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, atribuyendo dicha actividad a la presencia de himenoptaecina (Cebrero *et al.*, 2020).

Mientras que Roshan *et al.* (2017) y Pasiás *et al.* (2018) analizaron mieles australianas y de Grecia respectivamente, las cuales inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Si bien las mieles de diferentes orígenes botánicos y geográficos poseen propiedades antibacterianas contra diversos patógenos, las condiciones del procesamiento y almacenamiento pueden afectar esta característica (Chen *et al.*, 2012; Pimentel-González *et al.*, 2017; Matzen *et al.*, 2018).

Staphylococcus saprophyticus (*S. saprophyticus*) es una bacteria contaminante frecuente de la carne y alimentos fermentados, se puede encontrar en el tracto gastrointestinal, la vagina y el perineo del ser humano; es la causa del 20 % de las infecciones del tracto urinario en mujeres jóvenes, algunas de las complicaciones más graves incluyen pielonefritis aguda, nefrolitiasis y endocarditis (Kline y Lewis, 2016; Hashemzadeh *et al.*, 2021; Lawal *et al.*, 2021). La colonización por *S. saprophyticus* se produce a través de diferentes adhesinas, como las hemaglutininas y la lipasa asociadas a la superficie que forma apéndices superficiales similares a fimbrias, lo que ayuda a las bacterias a mantener una estrecha adherencia a estas superficies (Hashemzadeh *et al.*, 2021).

Se han identificado algunas cepas de *S. saprophyticus* resistentes a sulfametoxazol/trimetoprima, tetraciclina, penicilina, cefoxitina, clindamicina, ciprofloxacino, gentamicina y oxacilina (Hashemzadeh *et al.*, 2021; Lawal *et al.*, 2021). La resistencia a la penicilina se asoció con la presencia de mecA o blaZ. El gen mecA podría servir como marcador para inferir la resistencia a cefoxitina y oxacilina de *S. saprophyticus* (Zhang *et al.*, 2023).

Lo anterior demuestra que las concentraciones subinhibitorias de estos fármacos promueven la virulencia en las bacterias mediante la producción de biopelículas que confieren la resistencia a los antibióticos a través de procesos que incluyen la codificación de genes resistentes a los antibióticos; y la detección de fagos que podrían aumentar la patogenicidad los cuales se encuentran relacionados a dos linajes clonales (G y S) que se originaron en animales de producción/alimentación y humanos (Benini *et al.*, 2019; Lawal *et al.*, 2021).

Por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo determinar las propiedades antibacterianas de las mieles tabasqueñas contra patógenos como lo es *S. saprophyticus* usando los métodos de dilución en caldo y difusión en agar.

Material y Métodos

1. Recolección de muestras

Para el desarrollo de la presente investigación,



se consideraron 10 muestras de mieles, procedentes de distintos apiarios de Tabasco: 4 de Huimanguillo (muestra 3, 4, 5 y 6), 3 de Comalcalco (muestra 8, 9 y 10), 2 de Centro (muestra 2 y 7) y 1 de Balancán (muestra 1). Las muestras se almacenaron en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente hasta su análisis en laboratorio, el cual, se realizó en la Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal (UNIBVE) del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan (ITSA) en la ciudad de Acayucan, Veracruz. Los ensayos de CMI y CMB se desarrollaron por triplicado usando diluciones de miel a 75, 37.50, 18.75, 9.38 y 4.69 % (v/v), preparado en caldo nutritivo (DIBICO®), adecuando la metodología empleada por Osés et al. (2016).

2. Cinética de crecimiento

Para los ensayos, la cepa pura de *S. saprophyticus*, donada por el laboratorio de Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Popular de la Chontalpa, se inoculó en caldo nutritivo estéril (DIBICO®), se incubó a 37°C en una incubadora shaker orbital (Labnet International®, 311DS) a 250 rpm y se realizaron mediciones en el espectrofotómetro (Bio RAD®SmartSpec Plus) a 600 nm cada hora para obtener los cambios en la densidad óptica (OD) y realizar la curva de crecimiento. De esta manera se obtuvo un cultivo en fase estacionaria temprana (0.6 OD) (Fangio et al., 2007).

3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de difusión en agar

Una alícuota de 100 µL de *S. saprophyticus* en fase exponencial fue tomada e inoculada en cajas de Petri de 10 cm de diámetro que contenían 30 mL de agar nutritivo estéril solidificado. En cada placa se cortaron 3 pocillos de 8 mm de diámetro, en cada pocillo se depositaron 100 µL de miel diluida en caldo nutritivo al 75, 37.50, 18.75, 9.38 y 4.69 % v/v con tres repeticiones cada una. Se utilizó una placa con agar nutritivo sin miel inoculada (control positivo) y una placa con agar nutritivo y 25 µg/mL de Ciprofloxacino (control negativo) con tres repeticiones cada una y se incubaron a 37 °C durante 24 h (Osés et al., 2016).

4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en caldo

Se utilizaron tubos falcón que contenían 20 mL de cada una de las concentraciones de miel (75, 37.50, 18.75, 9.38 y 4.69 %) (v/v) y se inocularon con 100 µL del microorganismo con tres réplicas por dilución. Los tubos de control de cada concentración de miel se prepararon añadiendo 20 mL de caldo nutritivo y 100 µL del microorganismo como control positivo y como control negativo se utilizaron tubos con 20 mL de caldo nutritivo y 25 µL de Ciprofloxacino, con tres repeticiones cada una. Los tubos se incubaron a 37°C durante seis

horas en una incubadora shaker orbital (Labnet International®, 311DS) a 250 rpm, cada hora se tomó un mL y se midió la OD a 600 nm utilizando el espectrofotómetro (BioRAD® SmartSpec Plus) y se registraron tanto el crecimiento y la CMI (Osés *et al.*, 2016).

5. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

A continuación, se tomaron 100 µL de cada tubo en el que el crecimiento bacteriano se inhibió, se inocularon en agar nutritivo y se incubaron durante toda la noche a 37°C con el fin de determinar si la actividad antibacteriana de las muestras de miel fue bacteriostático o

bactericida. Se consideraron las cajas Petri con el crecimiento de colonias visibles para exhibir actividades bacteriostáticas, mientras que aquellas con ningún crecimiento se registraron exhibiendo actividades bactericidas.

Resultados y Discusiones

1. Cinética de crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus*

Mediante el ensayo por dilución en caldo se caracterizó la cinética de crecimiento de la cepa (Figura 1). La fase exponencial ocurrió en las primeras cuatro horas de incubación, seguida de fase estacionaria.

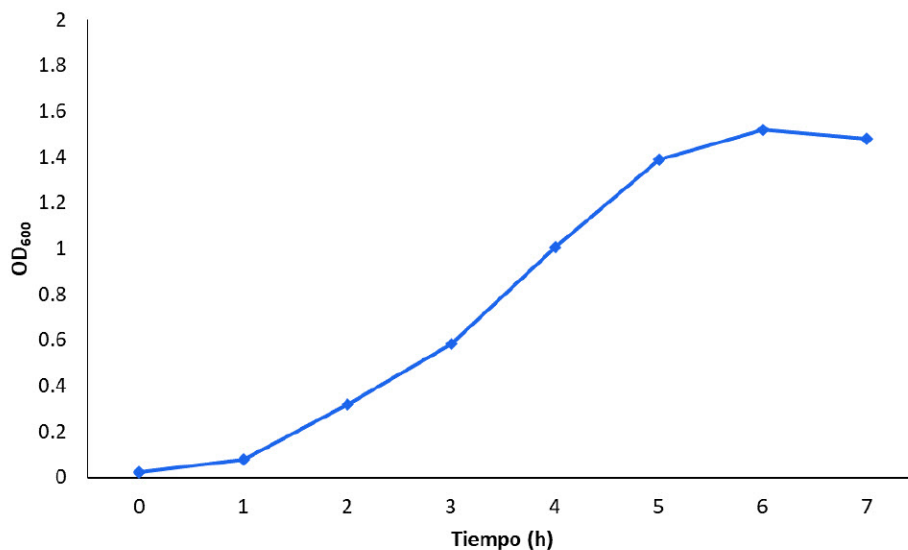


Figura 1. Cinética de crecimiento de *S. saprophyticus*

2. CMI

Para casi todas las muestras de miel probadas, hubo una inhibición total del crecimiento de *S. saprophyticus* en la concentración más alta (75%) por difusión en agar y dilución en caldo, exceptuando a la muestra 7, la cual no logró inhibir a dicha bacteria (Figura 2 y 3). Cuatro de las muestras presentaron actividad antibacteriana a una concentración de 18.75%. Los mejores resultados se detectaron en las muestras 3 y 5 (Figura 4), pertenecientes al municipio de Huimanguillo, donde se obtuvo una CMI de 9.38%. Un efecto contrario fue evidente cuando se realizó una prueba con miel a concentraciones de 4.69% donde las 10 muestras de miel presentaron crecimiento microbiano (Figura 2 y 3). Estos resultados demuestran que algunas de las mieles tabasqueñas tienen mayor

efecto antimicrobiano ante *S. saprophyticus*, en comparación a las mieles monoflorales reportadas por Alabbadi *et al.* (2022) donde se utilizaron concentraciones de 100, 50 y 25 %, siendo esta ultima la CMI a la cual fue sensible una cepa de *S. saprophyticus* resistente a vancomicina. Por otro lado, se reportó que la mieles de Manuka lograron inhibir a esta bacteria usando una concentración de 5 %, mientras que las mieles de Argelia necesitaron de concentraciones de entre 5 y 20 % (Bouacha *et al.*, 2023). Sin embargo, ocurrió un caso contrario en el estudio realizado en Pakistán donde la miel no logro inhibir a la bacteria, ni a ninguna otra probada, mencionando que la miel no poseía el efecto antibacteriano esperado (Wahid, 2021).

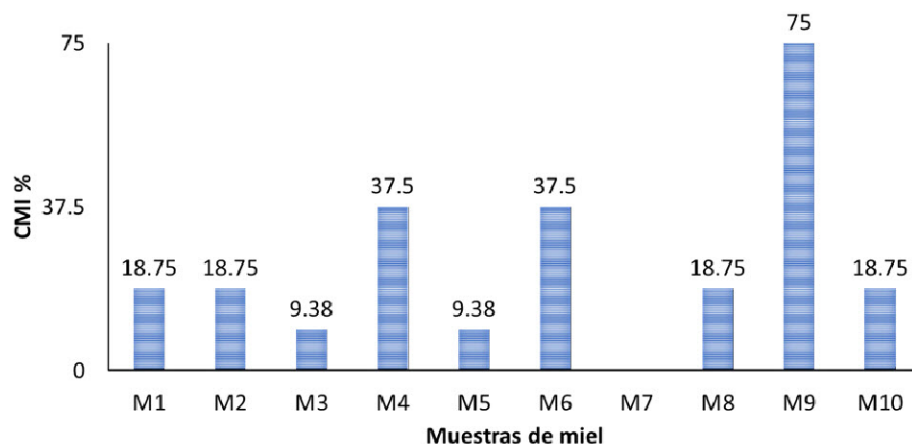


Figura 2. CMI por el método de difusión en agar donde M1: Balancán, M2: Centro, M3: Huimanguillo, M4: Huimanguillo, M5: Huimanguillo, M6: Huimanguillo, M7: Centro, M8: Comalcalco, M9: Comalcalco, M10: Comalcalco.

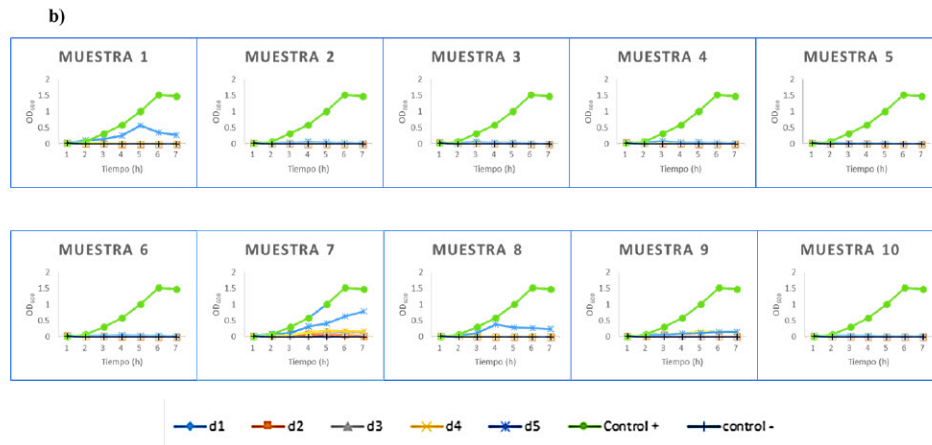


Figura 3. CMI por dilución en caldo donde d1: 75 %, d2: 37.5 %, d3: 18.75 %, d4: 9.38 % y d5: 4.69 %. Control +: caldo nutritivo + 100 μ L de *S. saprophyticus*, Control -: Ciprofloxacino 25 μ g/mL.

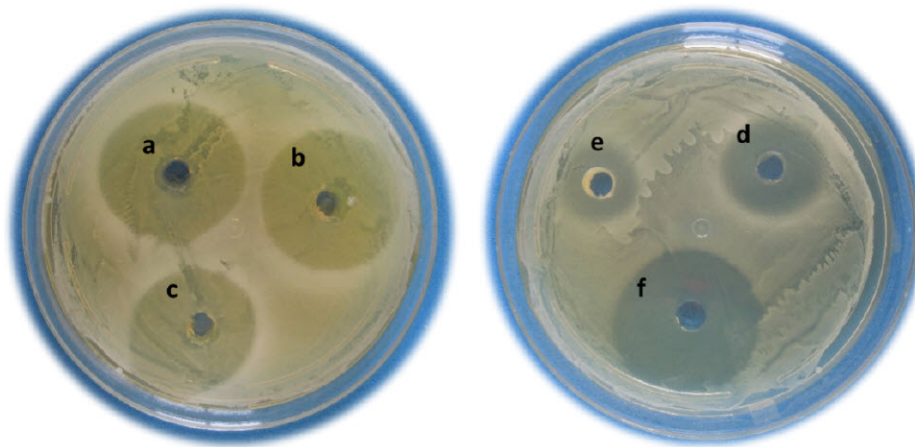


Figura 4. Halos de inhibición de la muestra 5 (Huimanguillo) a distintas diluciones, donde a) 75 %, b) 37.5 %, c) 18.75 %, d) 9.38 %, e) 4.69 % y f) Ciprofloxacino 25 μ g/mL.

3. CMB

Se logró determinar que la actividad antibacteriana de las muestras de miel fue bactericida, al no presentar ningún crecimiento de colonias en agar nutritivo después de 24 horas de incubación. Por lo tanto, la CMB fue

exactamente igual a la CMI (Tabla 1). En la miel de manuka se encontró un efecto bactericida a concentraciones de 10 %, mientras que las mieles de Argelia requerían de concentraciones de entre 10 y 40 % (Bouacha *et al.*, 2023).

Muestra	Concentración de miel %	Staphylococcus saprophyticus		
		UFC/mL	Efecto bactericida	
Control positivo	0	1.18×10^9	NO	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	1. Balancán	18.75	0	Si
		9.38	1.26×10^7	No
2. Centro	4.69	2.19×10^8	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	0	Si	
	9.38	1.28×10^7	No	
3. Huimanguillo	4.69	1.92×10^7	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	0	Si	
	9.38	0	Si	
4. Huimanguillo	4.69	1.12×10^7	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	4.8×10^6	No	
	9.38	1.28×10^7	No	
5. Huimanguillo	4.69	2.0×10^7	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	0	Si	
	9.38	0	Si	
6. Huimanguillo	4.69	4.8×10^6	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	5.6×10^6	No	
	9.38	8.8×10^6	No	
7. Centro	4.69	2.32×10^7	No	
	75	2.48×10^7	No	
	37.5	2.88×10^7	No	
	18.75	3.12×10^7	No	
	9.38	6.0×10^7	No	
8. Comalcalco	4.69	1.58×10^8	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	0	Si	
	9.38	4.0×10^6	No	
9. Comalcalco	4.69	1.94×10^8	No	
	75	0	Si	
	37.5	7.2×10^6	No	
	18.75	1.12×10^7	No	
	9.38	1.09×10^8	No	
10. Comalcalco	4.69	1.18×10^8	No	
	75	0	Si	
	37.5	0	Si	
	18.75	0	Si	
	9.38	2.24×10^7	No	
	4.69	2.48×10^7	No	

Tabla 1. Concentración mínima bactericida expresada en UFC/mL a diferentes concentraciones de miel contra *S. saprophyticus*.

Conclusiones

Ambos métodos empleados arrojaron resultados similares (difusión en agar y dilución en caldo), es necesario destacar que el método de dilución en caldo es de menor costo, debido a que se requiere de menos material, proporciona la concentración mínima bactericida y adicionalmente muestra el comportamiento del microorganismo a través de la cinética de crecimiento. Con los resultados obtenidos podemos demostrar que las mieles tabasqueñas poseen efectos antibacterianos, quizás los constituyentes de estas mieles: como alto contenido peróxido de hidrógeno en combinación con los fenoles y los flavonoles entre otros que causen esta inhibición en el crecimiento de esta bacteria patógena.

Por lo que es necesario realizar más estudios y extender el área de muestreo para identificar otras mieles con el mismo potencial, así como identificar las fuentes florales que proporcionan dichas características.

Agradecimientos

Heydi Lorena Arias de la Cruz (813762/619177), agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto de investigación, a la Universidad Popular de la Chontalpa, al Instituto Tecnológico Superior de Acayucan (ITSA) y al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco por las facilidades otorgadas para poder realizar la fase

Referencias y Bibliografía

- Alabbadi, A. A. A., Ahmed, M. M., Bashir, M. B. M., Mahjaf, G. M., & Gorish, B. M. T. (2022). *In vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Bee Honey against Gram-Positive Cocci Bacteria Isolated from Clinical Specimen in Shendi Town*. International Journal of Pathogen Research, 9(4), 24-30. doi.org/10.9734/ijpr/2022/v9i430233.
- Arends S. J. R., Butler, D., Scangarella-Oman, N., Castanheira, M., & Mendes, R. E. (2023). *Antimicrobial Activity of Gepotidacin Tested against Escherichia coli and Staphylococcus saprophyticus Isolates Causing Urinary Tract Infections in Medical Centers Worldwide (2019 to 2020)*. Antimicrob Agents Chemother 67(4), 1-9. <https://doi.org/10.1128/aac.01525-22>.
- Benini, M. K., Martison F. A., Cataneli, P. V., Pinheiro, L. P., de Oliveira, A., & Ribeiro, S. C. M. L. (2019). *In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of Staphylococcus saprophyticus isolated from patients with urinary tract infections*. Frontiers in Microbiology, 10(40), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00040>.
- Bouacha, M., Besnaci, S., & Boudiar, I. (2023). *Comparative study of the antibacterial activity of algerian honeys and manuka honey toward pathogenic bacteria from burn wound infections*. Mikrobiolohichnyi Zhurnal, 85(2), 26-36. doi.org/10.15407/microbiolj85.02.026.
- Boussaid, A., Chouaibi, M., Rezig, L., Hellal, R., Donsi, F., Ferrari, G., & Hamdi, S. (2018). *Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia*. Arabian Journal of Chemistry, 11(2), 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.011>.
- Cabrero, G., Sanhueza, O., Pezoa, M., Báez, M. E., Martínez, J., Báez, M., & Fuentes, E. (2020).



- Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective.* Food Chemistry, 315(2019), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126296>.
- Chen, C., Campbell, T. L., Blair, E. S., & Carter, A. D. (2012). *The effect of standard heat and filtration processing procedures on antimicrobial activity and hydrogen peroxide levels in honey.* Frontiers in Microbiology, 3(2012), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00265>.
- Fangio MF, Iurlina, MO, Fritz R. *Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a Escherichia coli.* Revista Argentina de Microbiología. ISSN 0325-7541 versión On-line ISSN 1851-7617.
- Fyfe, L., Okoro, P., Paterson, E., Coyle, S., & McDougall, G. J. (2017). *Compositional analysis of Scottish honeys with antimicrobial activity against antibiotic-resistant bacteria reveals novel antimicrobial components.* LWT - Food Science and Technology, 79(2017), 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.023>.
- Hashemzadeh, M., Dezfuli, A. A. Z., Nashibi, R., Jahangirimehr, F., & Akbarian, Z. A. (2021). *Study of biofilm formation, structure and antibiotic resistance in Staphylococcus saprophyticus strains causing urinary tract infection in women in Ahvaz, Iran.* New Microbes and New Infections, 39(100831), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100831>.
- Kline, K. A., & Lewis, A. L. (2016). *Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract.* Microbiol Spectr, 4(2), 1-31. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0012-2012>.
- Lawal, O. U., Fraqueza, M. J., Bouchami, O., Worning, P., Bartels, M. D., Gonçalves, M. L., Paixão, P., Gonçalves, E., Toscano, C., Empel, J., Urbás, M., Domínguez, M. A., Westh, H., de Lencastre, H., & Miragaia, M. (2021). *Foodborne origin and local and global spread of Staphylococcus saprophyticus causing human urinary tract infections.* Emerging infectious diseases, 27(3), 880. <https://doi.org/10.3201%2Feid2703.200852>.
- Matzen, R. D., Zinck Leth-Espensen, J., Jansson, T., Nielsen, D. S., Lund, M. N., & Matzen, S. (2018). *The antibacterial effect in vitro of honey derived from various Danish flora.* Dermatology Research and Practice, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/7021713>.
- Mustafa, G., Iqbal, A., Javid, A., Manzoor, M., Aslam, S., Ali, A., Azam, S. M., Khalid, M., Farooq, M., Al-Naggar, Y., Ali-Alharbi, S., Ali-El, E. H., Abd-Malek, R., Qamer, S., & Hussain, A., (2022). *Antibacterial properties of Apis dorsata honey against some bacterial pathogens.* Saudi Journal Biological Sciences., 29(2022), 730-734. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.059>.
- Osés, S. M., Pascual-Mate, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernandez-Muino, M. A., & Sancho, M. T. (2016). *Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against Staphylococcus aureus.* NJAS - Wageningen, J. Life Sci., 78(2016), 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.005>.
- Pasias, I. N., Kiriakou, I. K., Kaitatzis, A., Koutelidakis, A. E., & Proestos, C. (2018). *Effect of late harvest and floral origin on honey antibacterial properties and quality parameters.* Food Chemistry, 242(2018), 513-518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.083>.

- Pimentel-González, D. J., Basilio-Cortes, U. A., Hernández-Fuentes, A. D., Figueira, A. C., Quintero-Lira, A., & Campos-Montiel, R. G. (2017). *Effect of thermal processing on antibacterial activity of multifloral honeys*. Journal of Food Process Engineering, 40(1), e12279. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12279>.
- Roshan, N., Rippers, T., Locher, C., & Hammer, K. A. (2017). *Antibacterial activity and chemical characteristics of several Western Australian honeys compared to Manuka honey and pasture honey*. Archives of Microbiology, 199(2), 347-355. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1308-3>.
- Shahid, F., Ashfaq, U. A., Saeed, S., Munir, S., Almatroudi, A., & Khurshid, M. (2020). *In silico subtractive proteomics approach for identification of potential drug targets in Staphylococcus saprophyticus*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(10), 1-10. <https://doi.org/10.3390/ijerph17103644>.
- Velásquez, P., Montenegro, G., Leyton, F., Ascar, L., Ramirez, O., & Giordano, A. (2020). *Bioactive compounds and antibacterial properties of monofloral Ulmo honey*. CYTA – Journal of Food., 18(1), 11-19. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1701559>.
- Wahid, H. A. (2021). 01. *Antibacterial Activities of plant extracts and honey on local bacterial isolates*. Pure and Applied Biology (PAB), 2(4), 116-121. doi.org/10.19045/bspab.2013.24001.
- Zhang, K., Potter, R. F., Marino, J., Muenks, C. E., Lammers, M. G., Dien, B. J., Dingle, C. T., Humphries, R., Westblade, F. L., Burnham, D. C. A. & Dantas, G. (2023). *Comparative genomics reveals the correlations of stress response genes and bacteriophages in developing antibiotic resistance of Staphylococcus saprophyticus*. Msystems, 8(6), 1-24. <https://doi.org/10.1128/msystems.00697-23>.

