

USO DE FITOEXTRACTOS EN EL CONTROL DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE BACTERIAS ENTEROPATOGENAS

R. Castro-Franco¹, C. A. Meza-Herrera¹,
M. del R. Contreras-Quiróz¹, J. Santos-García²

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo.
A.P. 8 Bermejillo, Durango. México. 35230. E-mail: cafrfael@hotmail.com

²Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
San Nicolás de los Garza, N.L. México. 66450

RESUMEN. El uso de fitocomponentes con propiedades bactericidas y(o) bacteriostáticas, además de incrementar el gradiente de acción en el desarrollo de nuevos agentes antibacteriales, también promueve el uso alterno de ciertas plantas del agostadero. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de fitoextractos de once plantas de ecosistemas áridos sobre el crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* y *Shigella dysenteriae*. Cuatro dosificaciones por extracto metanólico dentro de planta fueron evaluadas: 42.8 mg mL⁻¹, 28.5 mg mL⁻¹, 14.2 mg mL⁻¹ and 7.1 mg mL⁻¹. La actividad antibacteriana fue evaluada considerando el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento. Todos los fitoextractos evaluados inhibieron el crecimiento de uno o más microorganismos; los fitoextractos con mayor efecto inhibitorio fueron los provenientes de *Larrea tridentata*, *Acacia farnesiana* y *Agave lechuguilla*. Con respecto a la concentración mínima inhibitoria, la tendencia indicó un efecto de inhibición en bacterias Grampositivas conforme se incrementó la concentración del fitoextracto. El mayor efecto de inhibición bacterias Gram negativas fue observado a la concentración de 28.5 mg mL⁻¹. El uso potencial de los fitoextractos parece ser una alternativa viable para el control o inhibición del crecimiento de bacterias enteropatógenas. Dicha estrategia permitiría hacer un uso alternativo de ciertas fitoespecies de ecosistemas áridos que poseen un bajo o nulo valor forrajero como es el caso de *Larrea tridentata*, promoviendo una diversificación en el uso de los recursos bióticos de ecosistemas áridos.

Palabras clave: Microorganismos.

SUMMARY. The use of phytochemicals with bactericide and(or) bacteriostatic properties, besides to increase the possibilities to develop new antibacterial agents, it also promotes an alternative use of some rangeland plants. Aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of eleven phyto-extracts from arid and semiarid ecosystems on growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* and *Shigella dysenteriae*. Four phyto-extract methanolic concentrations within plant were evaluated: 42.8 mg mL⁻¹, 28.5 mg mL⁻¹, 14.2 mg mL⁻¹ and 7.1 mg mL⁻¹. The antibacterial activity was evaluated by measuring the inhibition-zone diameter observed. All the evaluated phyto-extracts inhibited growth of a least one microorganism; the greatest inhibitory effect on bacterial growth was depicted by the phyto-extracts from *Larrea tridentata*, *Acacia farnesiana* as well as *Agave lechuguilla*. With respect to the minimal inhibitory concentration, the observed trend depicted a larger inhibitory growth effect on Gram positive bacteria as the phytoextract concentration increased. In the same way, the largest inhibitory growth effect in Gram negative bacteria was observed at 28.5 mg mL⁻¹ concentration. The potential use of phytoextracts appears to be a feasible alternative to control or inhibit growth of certain microorganisms. Moreover, this approach also permits to make an alternative use of certain phytospecies from arid ecosystems depicting a null or reduced forage value such as *Larrea tridentata*. The last, besides to promote a more diversified use of the rangeland's biotic resources, it also may increase the economic income of inhabitants from the arid and semiarid regions.

Key words: Organic fungicide.

INTRODUCCION

Gran parte de los países en vías de desarrollo dependen en gran medida del sistema tradicional de medicina para tratar una gran variedad de enfermedades. En efecto, en muchos países cientos de plantas son usadas en preparaciones naturales de medicina, siendo algunas veces fuente de drogas muy potentes. El 86%

de la población mundial hace uso de la medicina tradicional y la mayor parte de las terapias tradicionales envuelven el uso de fitoextractos de plantas o sus constituyentes activos (WHO, 1993).

México se destaca a nivel mundial por poseer una gran diversidad vegetal, con más de 26 mil especies las cuales conjuntan prácticamente todos los tipos

vegetativos. La elaboración de farmacopéas mexicanas en la segunda mitad del siglo pasado y a lo largo del actual, constituyeron las principales recopilaciones sobre el conocimiento de la flora medicinal del país. Dichas recopilaciones a cerca de plantas medicinales muestran que los componentes de varias plantas pueden utilizarse en el tratamiento de una o varias enfermedades (Estrada, 1985).

El uso de fitoextractos se remonta hasta tiempos ancestrales de la civilización egipcia quienes los usaban para preservar a sus muertos. En el mismo sentido, los griegos hacían uso de fitoextractos para eliminar algunas de las enfermedades más comunes de la época como indigestión y neumonía, así como conservadores de sus alimentos (Richard y Gallegher, 1979; Recio y Rios, 1989). Los primeros reportes científicos fueron escritos por Louis Pasteur en 1858, donde describió la efectividad del ajo y la cebolla como antibacterianos y antifúngicos (Block, 1983).

De acuerdo a Davis (1994), el uso indiscriminado de drogas antimicrobiales ha generado resistencia a muchos antibióticos por parte de ciertos microorganismos. Por lo anterior, es necesario desarrollar drogas antimicrobiales alternas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. La medicina herbolaria representa una rica fuente para obtener nuevos agentes quimioterapéuticos, antibacteriales, y fungicidas. En México, Verastegui *et al* (1996) demostró el efecto antimicrobiano de tres plantas de la zona norte de México contra nueve especies de bacterias y diez hongos, encontrando que los extractos inhibían el crecimiento de más de uno de los microorganismos probados.

Los objetivos del presente estudio fue evaluar la actividad antibacterial de once fitoextractos sobre el crecimiento in vitro de las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* y *Shigella dysenteriae*. Adicionalmente se establecieron los niveles de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias en los fitoextractos que mostraron efecto antibacterial.

MATERIALES Y METODOS

Localización y condiciones ambientales.

Las plantas evaluadas en el presente estudio se colectaron en el área perimetral de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas-Universidad Autónoma Chapingo, la cual se localiza entre las coordenadas UTM (Universal Transversal Marcador) 639,935 E y 2,864,331 N, correspondiendo a las coordenadas geográficas 25°52'28" LN y 103°37'07" LO. El área se encuentra a

una altitud de 1119 msnm, con clima seco-cálido BW, con lluvias en verano y oscilación térmica extrema; mientras que la precipitación media anual es 217.1 mm, la temperatura anual promedio 22.3°C (Bárcenas, 1999).

Colecta de plantas y maceración. En Septiembre de 1999 se colectaron ejemplares de *Opuntia megacantha* del vivero de la URUZA, *Prosopis chilensis* del Jardín Botánico y mientras que *Atriplex canescens*, *Cynodon dactylon*, *Cenchrus ciliaris* fueron colectadas en los alrededores de la URUZA. Las plantas se colocaron en bolsas de papel y desecadas a 45° C. Por su parte los tres cultivares de *Opuntia megacantha* (2, 6 y 8) debido a su abundante contenido de agua fueron expuestas por 24 h a temperatura ambiente y desecadas posteriormente durante 24 h a 45° C. Las leguminosas y gramíneas, se mantuvieron por 24 h a la misma temperatura; *Atriplex canescens* requirió 48 h en desecación. Una vez desecadas, las plantas se colocaron en recipientes que impedían el paso de la luz, se les agregó metanol al 60% hasta cubrir las plantas y fueron cerrados herméticamente por un período de cinco días para completar su maceración (Volak *et al.*, 1988).

Preparación de fito-extractos

Concentración y dilución. El material macerado se colocó dentro de los matraces de concentración, sobre un soporte y un mechero. Mediante el uso de un matraz Soxhlet se realizó la separación del metanol y el extracto de la planta por medio de condensación. Posteriormente, se vaciaron en cápsulas de porcelana, y se desecaron a 45° C. La dilución de los fitoextractos fue en una proporción de 1 g fitoextracto por 5 mL de agua destilada estéril; la dilución de llevo al cabo entre dos mecheros para evitar su contaminación, agregándose a un tubo de ensaye previamente esterilizado y cubierto con papel aluminio.

Microorganismos. Los microorganismos usados fueron: *Enterobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*. Los microorganismos fueron donados por el Laboratorio de Bioquímica y Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, trasladándolos en un medio sólido al Laboratorio de Sistemas Agrícolas de la URUZA.

Preparación de los medios de cultivo

Medios líquido y sólido. La siembra de las bacterias se realizó primero en un medio líquido llamado Infusión Cerebro Corazón, el cual fue utilizado en una proporción de 37 g:1000 mL de agua. El medio sólido utilizado fue el agar de Muller Hinton, el cual se preparó en una proporción de 38 g por 1000 mL de agua, y se

esterilizó a presión durante 15 m; posteriormente se colocó en cajas de petri desechables (20 mL por caja).

Siembra en medio líquido. Con una asa de platino se colectó una muestra del medio sólido y se introdujo al medio líquido para iniciar el proceso de infección. Con objeto de promover el crecimiento de la población bacteriana la muestra se incubó durante 18 h a 27° C, para ser posteriormente trasladada al medio sólido.

Siembra en medio sólido. Se tomó una alícuota de 700 mL de Infusión Cerebro Corazón previamente sembrada durante 18 h, la cual contenía 7×10^6 bacterias que se pasaron a una caja de petri con agar de Muller Hinton, llevando a cabo la difusión en agar. Para lo anterior se tomó una asa de vidrio previamente desinfectada en alcohol, quemada en el mechero y enfiada, distribuyendo la infusión de Cerebro Corazón que contenía las colonias bacterianas sobre la superficie del agar. Después, con un tubo Durham de 11 mm de diámetro desinfectado en alcohol, quemado y enfiado, se realizó la técnica de poseo en agar, haciendo pequeños orificios en el agar para colocar las alícuotas de extracto y el testigo que fue agua destilada estéril.

Posteriormente, con una aguja de disección desinfectada en alcohol, quemada y enfiada, se procedió a retirar de la caja los círculos de agar formados por el tubo Durham, vaciándose sobre un vaso de precipitados. Al tener ya los pozos libres de agar, los fitoextractos fueron agitados en un agitador Vortex-Genie para tener una mezcla más homogénea. Se le colocó a la pipeta una puntilla para tomar una alícuota de 700 mL de cada extracto así como de agua destilada estéril y se colocó en el lugar correspondiente a su identificación en la caja de Petri. Al final, la mesa de trabajo fue limpiada para evitar una contaminación con material bacteriológico, se esterilizaron las puntillas utilizadas, y demás material que hubiera sido contaminado con los microorganismos así como el vaso de precipitado conteniendo los discos de agar contaminados con bacterias. En seguida, las cajas fueron llevadas a la estufa e incubadas durante 24 h a 27° C. La actividad antibacteriana fue medida por el diámetro de la zona observada. Una vez transcurrido dicho tiempo, se revisaron las cajas y se documentó la información obtenida. Al finalizar el trabajo, las cajas fueron esterilizadas en la olla de presión y desechadas posteriormente.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Para determinar la CMI, se llevo a cabo una siembra en medio líquido en la forma mencionada anteriormente y posteriormente se realizó la siembra en medio sólido,

siendo la alícuota de 700 ml de fito-extracto, cambiando solo su concentración. Solo se probaron las CMI sobre los microorganismos que tuvieron respuesta de actividad antimicrobiana a los fitoextractos probados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Microorganismos. Todas los fitoextractos evaluados mostraron actividad antimicrobiana al menos en uno de los microorganismos probados. Enterobacter aerogenes fue inactivada por siete (63%) de los fitoextractos evaluados; mientras que el más efectivo fue *Agave lechuguilla*, el que mostró menor eficacia de los siete fitoextractos fue *Larrea tridentata*. *Shigella dysenteriae* fue afectada por el 100% de los fitoextractos; él más activo fue *Larrea tridentata* y el menos activo *Opuntia megacantha-6*. El crecimiento de *Bacillus cereus* fue afectado por nueve fitoextractos (82%), mostrando la mayor inhibición *Agave lechuguilla* y la menor eficacia *Opuntia megacantha-2*. El crecimiento de *Staphylococcus aureus* fue inhibido por siete fitoextractos (64%) observando mayor actividad por parte de *Larrea tridentata* y menor con *Cenchrus ciliaris* y *Atriplex canescens*; el crecimiento de *Escherichia coli* solo fué inhibido por *Larrea tridentata*. El tratamiento control que consistió en agua destilada estéril no mostró efecto alguno sobre los microorganismos.

Concentración Mínima Inhibitoria. Al evaluar las diferentes CMI establecidas se observó que en la concentración de 42.8 mg mL⁻¹ de *Prosopis chilensis* solo inhibió a *S. aureus*, la CMI 28.5 mg mL⁻¹ afectó a *S. aureus*, *S. dysenteriae* y *Bacillus*; las concentraciones restantes no mostraron efecto alguno. *Cenchrus ciliaris* solo afectó el crecimiento en las concentraciones 42.8 mg mL y 28.5 mg mL de *S. aureus* en una sola repetición. Las CMI de *A. farnesiana*, mostró mayor actividad sobre *B. cereus* en las concentraciones 42.8 mg mL, 28.5 mg mL y 14.2 mg mL. Las cuatro CMI de *A. lechuguilla* mostraron efecto sobre las bacterias probadas, observándose la mayor actividad sobre *B. cereus* y *S. aureus*, y la menor actividad sobre *E. aerogenes*.

Las cuatro concentraciones de *L. tridentata* inhibieron el crecimiento de *E. coli*, además de modificar el crecimiento de *S. dysenteriae*, *B. cereus*, *S. aureus*. El efecto de *J. dioica* solo se observó en *S. dysenteriae* en una CMI de 28.5 mg mL. Por el contrario, *Atriplex canescens*, *Cynodon dactylon*, así como *Opuntia megacantha-2*; en ninguna de las cuatro CMI tuvieron efecto inhibitorio sobre los microorganismos probados. El uso del testigo control utilizado, en este caso agua destilada estéril, no mostró ningún efecto de inhibición del crecimiento de los microorganismos probados.

CONCLUSIONES

Los once fitoextractos evaluados en la presente investigación inhibieron el crecimiento de al menos una de las bacterias enteropatógenas. El mayor efecto de inhibición del crecimiento bacteriano lo generó *Larrea tridentata*, aún cuando su concentración fue de 100 mg mL⁻¹, la menor con respecto a los fitoextractos restantes (200 mg mL⁻¹).

Shigella dysenteriae fue la única bacteria susceptible al 100 % de los fitoextractos probados.

Al evaluar eficiencia antibacteriana tanto *Agave lechuguilla* como *Larrea tridentata* mostraron el mayor halo de inhibición al menos en el 50% de los microorganismos.

Con respecto a la concentración mínima inhibitoria, el mayor efecto inhibitorio fue observado sobre bacterias Gram positivas, generándose una correlación positiva entre la concentración del fitoextracto y el efecto inhibitorio del mismo.

Para las bacterias Gram negativas, el mayor efecto inhibitorio se observó a una concentración de 28.5 mg mL⁻¹.

El uso potencial de fitoextractos de plantas de contextos ecológicos áridos se presenta como una alternativa viable para desarrollar compuestos que ejerzan un control y/o inhibición del crecimiento de bacterias enteropatógenas.

LITERATURA CITADA

Bárcenas, A.M. 1999. Acumulación de prolina en raíces de dos cultivares de nopal *Opuntia* spp bajo ten-

sion por calor. Tesis Licenciatura. URUZA-UACH.

Block, E. 1983. "Química del ajo y la cebolla". Prensa Científica. p. 86-92.

Davis, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*. 264:375-382.

Estrada, E. 1985. Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

Recio, M., y J.L. Rios. 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in literature 1978-1988. *Phytother. Res.* 3(4):117-125.

Richard, J., y R. Gallegher. 1979. Multiple toxin production by isolated strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* 67:161-163.

Verastegui, M., C. Sánchez, N.L. Heredia, and J.S. García. 1996. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. *J. Ethnopharmacol.* 52:175-177.

Volak, J., y J. Stodola. 1988. El Libro de las Hierbas Medicinales. Editorial Susaeta-Artia

WHO (World Health Organization) 1993. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gam* 28:13-14.