

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Elaboración de un Agar casero a base de Origanum vulgare, Aloysia citrodora y Avena sativa para el crecimiento cepas de Escherichia coli

Centro Experimental de Fitofármacos de la Universidad Privada del Valle 2017

Elaboration of a homemade agar based on Origanum vulgare, Aloysia citrodora and Avena sativa for the growth of Escherichia coli strains

Phytopharmaceuticals Experimental Center of Universidad Privada del Valle 2017

1. Andrés Fernández Rivera, 2. Ghislain S. Ajhuacho Llampá, 3. Paola A. López Florero



1. Licenciado en Bioquímica y Farmacia. Coordinador del Centro Experimental de Fitofármacos. Universidad Privada del Valle Cochabamba

afernandezri@univalle.edu

2. Estudiante de la Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Privada del Valle Cochabamba

ghis_all@hotmail.com

3. Estudiante de la Carrera de Bioquímica y Farmacia. Universidad Privada del Valle Cochabamba.

paola_lopezf@outlook.es

Derechos de Autor © 2017 Andrés Fernández Rivera; Ghislain S. Ajhuacho Llampá; Paola A. López Florero.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir –copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato –y Adaptar el documento –remezclar, transformar y crear a partir del material –para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución — Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

RESUMEN

Los medios de cultivo son una herramienta básica en el campo del análisis clínico y la investigación, siendo con el tiempo cada vez más específicos y al mismo tiempo más costosos. El centro de experimentación de fitofármacos plantea una alternativa viable y económica utilizando *Avena Sativa* y Agar base como nutrientes básicos para el crecimiento y desarrollo de microorganismos. Debido a la presencia de carbohidratos, peptona y cloruro de sodio en el agar, se inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos con la adición de extractos hidroalcohólicos de *Origanum vulgare* y *Aloysia citrodora*. De esta forma se logra desarrollar el crecimiento específico de cepas de *E. coli* en un medio de cultivo natural, el cual puede estar al alcance de cualquier laboratorio clínico en áreas rurales o metropolitanas.

Palabra clave: Agar. Cultivo microbiológico en farmacología. Sinergismo farmacológico.

ABSTRACT

*Microorganism's growth mediums are a basic tool in the field of clinical analysis and research, being increasingly more specific and costly over time. The phytopharmaceutical experimentation center proposes a viable and economical alternative using *Avena Sativa* and Agar base as basic nutrients for the growth and development of microorganisms. Due to the presence of carbohydrates, peptone and sodium chloride in the agar, the growth of Gram positive bacteria and fungi was inhibited with the addition of hydroalcoholic extracts of *Origanum vulgare* and *Aloysia citrodora*. In this way it is possible to develop the specific growth of *E. coli* strains in a natural culture medium, which can be within the reach of any clinical laboratory in rural or metropolitan areas.*

Keywords: Agar. Microbiological cultive in pharmacology. Pharmacological synergism.

INTRODUCCIÓN

Debido al gran crecimiento del área de microbiología en los laboratorios para poder verificar que tipo de microorganismo se encuentra como hospedero en nuestros pacientes, se necesitan de distintos medios para el crecimiento de los mismos, llamados agares.

Con el paso del tiempo, estos agares evolucionaron adquiriendo más "cualidades", siendo estos más selectivos para las necesidades que requieren las bacterias y así ver el crecimiento y desarrollo que tienen cada una y poder identificarlas debido a las distintas características que presentan como: diferencia en el color de las colonias, la mucosidad de éstas y también que algunas desprenden un olor característico. Dichos agares fueron aumentando en su costo debido a los distintos componentes empleados para que resulten más selectivos, siendo éste un problema para laboratorios pequeños que se encuentran en provincias o que recién empiezan a ofrecer servicios para la sociedad (1).

La *E. Coli* es una especie bacteriana de considerable importancia científica, económica y médica. Están incluidas en esta especie cepas no patógenas y otras que son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales. La mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos (2).

No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas). *E. coli* provoca en seres humanos del orden de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775 000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Además, es el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones urinarias y septicemias en humanos, por lo que es de vital importancia contar con las herramientas necesarias para realizar una detección y acción preventiva (3).

Con el presente trabajo de investigación se elaboró un agar alternativo "natural" para el crecimiento y desarrollo de bacterias Gram negativas en específico *E. coli* usando avena y agar base como nutrientes principales y extractos hidroalcohólicos de orégano y cedrón como inhibidores de crecimiento de Gram positivos y hongos, con la finalidad de brindar a la sociedad una alternativa eficiente y económica en el área clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por su enfoque, se trata de un trabajo de carácter analítico cuantitativo y descriptivo experimental porque se procede a la manipulación activa y sistémica de variables independientes.

La presente investigación se realizó en el Centro Experimental de Fitofármacos de la Universidad Privada del Valle, campus Tiquipaya.

Recolección de la muestra

Las plantas de orégano *Origanum vulgare* y cedrón *Aloysia citrodora* fueron recolectadas del mercado 25 de mayo, ubicado en la calle San Martín casi Aroma; de ambas plantas se utilizaron sólo las hojas, las cuales fueron seleccionadas y lavadas con agua destilada, posteriormente se realizó la desinfección del material vegetal con una solución de hipoclorito de sodio a 80ppm por un rango de tiempo de 30 minutos y finalmente se dejó secar en sombra por 7 días a temperatura ambiente.

Obtención de los extractos

El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de Orégano *Origanum vulgare* fue obtenido por maceración con un solvente etanólico al 70 % en periodo de 48 horas.

El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de Cedrón *Aloysia citrodora* fue obtenido por maceración con un solvente etanólico al 70 % en periodo de 48 horas.

Concentración y dosificación de los extractos

Los extractos macerados fueron concentrados al vacío utilizando un Rotaevaporador hasta adquirir una consistencia semipastosa (4) (5).

A cada muestra se le realizó la prueba de sólidos totales para determinar el porcentaje de humedad presente en los extractos, con el objetivo de determinar la dosificación de los extractos en el medio de cultivo. Para esto se sometieron los extractos a 120 °C por un periodo de 12 horas, hasta que mantengan un peso constante.

Marcha fitoquímica preliminar

Utilizando la técnica desarrollada por Olga de Look se realizó el tamizaje fitoquímico de cada extracto por separado para identificar sus componentes más importantes.

Determinación de concentración mínima inhibitoria

Mediante esta técnica se definió la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento visible de bacterias Gram positivas después de 24 horas de su incubación a 37°C, al mismo tiempo se definió la concentración mínima para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras después de 7 días de su incubación a 35 °C. Se utilizaron mezclas de ambos extractos en diferentes proporciones y posteriormente se realizó un análisis estadístico para comprobar y demostrar la acción farmacológica de cada concentración frente a los microorganismos (1).

Elaboración del agar casero a base de Avena y Orégano

Se realizó la elaboración del agar casero utilizando agar base, avena y los extractos de orégano *Origanum vulgare* y cedrón *Aloysia citrodora*; al mismo tiempo se realizó la preparación de agar McConkey que fue tomado como control positivo (6).

Sembrado de *E. coli* en los agares

Se diluyó la cepa ATCC 25922 de *E. coli* usando como referencia el tubo con la dilución 0.5 en la escala de McFarland, la cual se sembró en el agar casero de avena y el agar McConkey respectivamente. Se realizó la siembra por triplicado y se dejó en la estufa de cultivo a 35 °C por 48 horas (6) (7).

Identificación de colonias

Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a realizar el seguimiento del crecimiento de las bacterias de *E. coli* en ambos agares de forma visual, también se realizaron pruebas de identificación para comprobar que la bacteria es de hecho una *E. coli*, para lo cual se utilizó la técnica de Ziehl Neelsen para la identificación de bacterias Gram negativas en los agares y posteriormente se realizó una serie bioquímica a las cepas para confirmar el crecimiento de *E. coli* en los medios de cultivo (7).

RESULTADOS

En la tabla N°1 se demuestra la presencia de triterpenos, saponinas y alcaloides que son los principales responsables de la actividad antibacteriana del extracto de orégano. Así también se puede observar la presencia de esteroides en el extracto de cedrón, principal responsable de su actividad antibacteriana.

Tabla N°1. Marcha fitoquímica

Metabolito	Orégano	Cedrón
Alcaloides		
Wagner	+++	+
Mayer	-	-
Draguendorf	+	-
Flavonoides	++	+
Hidratos de carbono	+++	+
Esteroides	-	+++
Tripertenos	+++	-
Saponinas	+++	+
Taninos	++	+++
Antraquinas	+++	-

Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

Sólidos totales

En la tabla N°2 se encuentran los pesos del extracto seco deshidratado de orégano y cedrón, los cuales se realizaron por duplicado.

Tabla N°2. Peso de la muestra en proceso de deshidratación

Peso (mg)	Orégano		Cedrón	
P_o inicial	47,5877	43,9593	43,3449	58,0393
6 horas	46,6746	43,0317	42,4040	55,1213
8 horas	46,6744	43,0315	42,4041	55,1215
12 horas	46,6751	43,0313	42,4048	55,1221
P_f final	46,6747	43,0315	42,4043	55,1216

Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

En la tabla N°3 podemos observar los sólidos totales que presenta cada extracto, así como también el porcentaje de humedad de cada uno, datos a partir de los cuales se calcula la cantidad de principio activo presentes en un mililitro de cada extracto.

Tabla N°3. Solidos totales y porcentaje de humedad presente en la muestra

Fórmulas	Orégano		Cedrón	
$P_0 = P_{CM} - P_{CV}$	0,9478	0,9646	0,9782	0,9548
$P_F = P_{CMF} - P_{CV}$	0,0348	0,0368	0,0376	0,0371
$\%H = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100$	96,33%	96,18%	96,16%	96,11%
$S_T = 100 - \%H$	3,67	3,82	3,84	3,89
Sólidos totales	3,75		3,87	

Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

Donde:

 P_0 = Peso inicial P_{CM} = Peso de la caja con muestra P_{CV} = Peso de la caja vacía P_F = Peso final P_{CMF} = Peso de la caja con muestra

% H = Humedad

 S_T = Solidos totales P_{CMF} = Peso de la caja con muestra final P_{cv} = Peso de caja vacía**ORÉGANO:**

$$3,75 \text{ ml} \quad \text{---} \quad 100 \text{ ml}$$

$$X \quad \text{---} \quad 1 \text{ ml}$$

X = 0,0375 ml de principio activo en 1 ml de extracto de orégano.

CEDRÓN:

$$3,87 \text{ ml} \quad \text{---} \quad 100 \text{ ml}$$

$$X \quad \text{---} \quad 1 \text{ ml}$$

X = 0,0387 ml de principio activo en 1 ml de extracto de cedrón.

Determinación de concentraciones inhibitorias para bacterias Gram positivas hongos

Según los resultados expresados en la tabla N°4, se puede observar que la concentración mínima para inhibir el crecimiento microbiano es de 500 µL de la dilución de ambos extractos por partes iguales.

Tabla N°4. Concentración inhibitoria mínima

Agar – Agar	Concentración de orégano µL	Concentración de cedrón en µL	Concentración total	Resultado
McConkey	62.5	62.5	125	Resistente
	125	125	250	Resistente
	250	250	500	Sensible
SDA	62,5	62,5	125	Resistente
	125	125	250	Resistente
	250	250	500	Sensible
Plate count	62,5	62,5	125	Resistente
	125	125	250	Resistente
	250	250	500	Sensible

Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

Lectura del crecimiento de E. coli en los agares

En la tabla N°5 se realizó una lectura a las 48 horas describiendo las características morfológicas y microscópicas de la bacteria que se presentan en los distintos agares.

Tabla N°5. Características morfológicas y microscópicas de la bacteria

Agar – Agar	Lectura morfológica	Lectura microscópica (Técnica de Ziehl Neelsen)
Agar McConkey	Se observaron colonias de color café negruzco, con bordes regulares mucoides.	Después de realizar la tinción de Gram, se pudo comprobar la presencia de bacterias Gram negativas en el medio.
Agar casero de avena	Se observaron colonias homogéneas de color beige con bordes regulares poco mucoides.	Después de realizar la tinción de Gram, se pudo comprobar la presencia de bacterias Gram negativas en el medio.

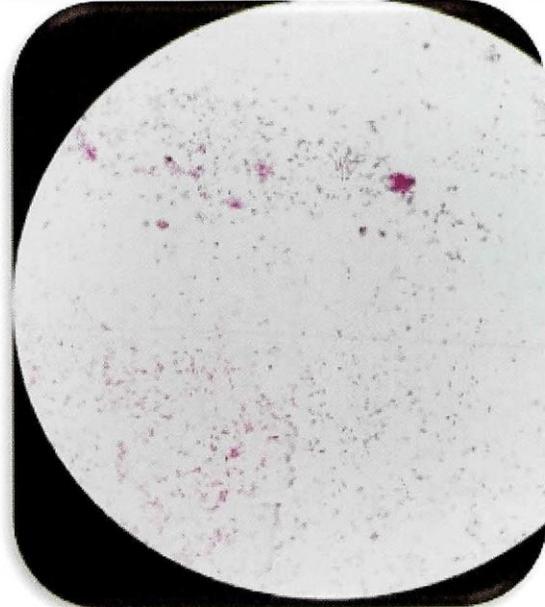
Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

Figura N°1. Crecimiento de *E. coli* en lugar en agar casero de avena y agar McConkey



Fuente: Elaboración propia, julio 2017

Figura N°2. Presencia de bacterias Gram negativas mediante la Tinción de Gram



Fuente: Elaboración propia, julio 2017

Identificación de colonias mediante pruebas bioquímicas

Para garantizar el crecimiento de la cepa de *E. coli* y descartar la posibilidad de contaminación en el Agar casero a base de *Avena sativa*, *Origanum vulgare* y *Aloysia citrodora*, se procedió a realizar pruebas bioquímicas para la identificación de las colonias.

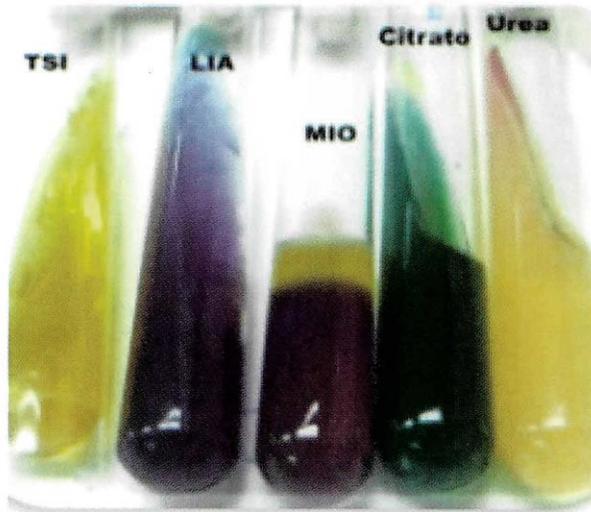
Como se puede observar en la tabla N°6, los resultados fueron idénticos tanto para el control positivo (Agar McConkey) como para el agar casero de avena, parámetros en los cuales se demuestra el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en ambos agares.

Tabla N°6. Identificación de *E. coli* por pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	Agar avena	Agar McConkey
TSI	Glucosa – Positivo	Glucosa – Positivo
	Lactosa – Positivo	Lactosa – Positivo
SIM	H ₂ S – Negativo	H ₂ S – Negativo
	Indol – positivo	Indol – positivo
	Motilidad – positivo	Motilidad – positivo
MIO	Motilidad – positivo	Motilidad – positivo
	Indol - positivo	Indol - positivo
	ORNITINA – Positivo	ORNITINA – Positivo
LIA	LISINA DESCARBOXILASA- Positivo	LISINA DESCARBOXILASA- Positivo
	H ₂ S – Negativo	H ₂ S – Negativo
	Gas - negativo	Gas – negativo
Urea	Negativo	Negativo
Citrato	Negativo	Negativo

Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

Figura N°3. Identificación de *E. coli* mediante serie bioquímica



Fuente: Elaboración propia, mayo 2017

CONCLUSIONES

Se demostró la actividad antibacteriana y antimicótica presente en los extractos de orégano "*Origanum vulgare*" y cedrón "*Aloysia citrodora*" a partir de una concentración de 250 µL para una carga bacteriana de 1.5 x10⁸ células por mL₃ (0.5 en la escala de Mcfarland).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maraví I y Gisella G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: Menta piperita (menta), Origanum vulgare (orégano) y Cymbopogon citratus (hierba luisa) sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Cándida albicans ATCC 90028. [tesis en Internet] Perú: Universidad Privada Norbert Wiener; 2012 [Consultado el 8 marzo de 2017] Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/GISELLA%20GIOVANNA%20MARAVI%20INGA.pdf>
2. Faleiro Naves P. Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. [tesis doctoral en Internet] España: Universidad Complutense de Madrid; 2009. [Consultado el 15 mayo de 2017] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>
3. Hernández Álvarez E. Escherichia coli productores de BLEE aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. [tesis doctoral en Internet] España: Universidad Complutense de Madrid; 2009. [Consultado el 15 mayo de 2017] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/10442/1/T31499.pdf>
4. Salamanca García MA y Sánchez Bermúdez MY. Extracción y caracterización de la oleoresina del orégano (Origanum vulgare). [tesis en Internet] Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2009 [Consultado el 8 marzo de 2017] Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1839/66502825159.pdf;jsessionid=E11A95426ACD3A7670EE43E922A28EEE?sequence=1>
5. Betancourt López L. Evaluación del aceite esencial de orégano en la dieta de los pollos de engorde. [tesis en Internet] Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2012. [Consultado el 8 marzo de 2017] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/6506/1/787020.2012.pdf>
6. I.C.T, S.L, CULTIMED. Manual Básico de Microbiología. Recomendaciones generales de empleo para los medios de cultivo deshidratados y preparados. [Internet] 2002 [Consultado el 30 mayo de 2017] Disponible en: <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>
7. Basaure P. Microorganismos/Nutrición y crecimiento [Internet] 2013 [Consultado el 29 mayo de 2017] Disponible en: [.http://www.manual-delombricultura.com/foro/mensajes/24224.html](http://www.manual-delombricultura.com/foro/mensajes/24224.html)

Se demostró la selectividad que poseen estos extractos para inhibir las bacterias Gram positivas a las concentraciones mencionadas anteriormente.

Se observó que es posible el crecimiento específico de la bacteria *Escherichia coli* en el agar casero a base de avena con extractos de orégano *Origanum vulgare* y cedrón *Aloysia citrodora*, demostrando así el potencial de este proyecto como una alternativa viable y económica para los diferentes laboratorios clínicos y hospitales de nuestro país.

RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los efectos que tienen los extractos alcohólicos del cedrón y orégano, se recomienda utilizar otro medio de extracción que incremente su potencial inhibitorio como una extracción de aceites esenciales, para poder probar su efectividad en el agar.

Se recomienda realizar un proceso de identificación y valoración de los metabolitos responsables de la inhibición de hongos y bacterias Gram positivas en los extractos de orégano *Origanum vulgare* y cedrón *Aloysia citrodora* mediante técnicas cromatografías o espectrofotométricas para de esta manera poder profundizar la investigación hacia un posible "agar natural" específico para bacterias las Gram negativas patógenas más comunes en el área de la microbiología.