

EXTRACTOS DE *Allium sativum* y *Origanum vulgare* COMO REDUCTORES DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, CAUSALES DE MASTITIS SUBCLÍNICA*

Extracts of *Allium sativum* and *Origanum vulgare* as reducers of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, causes of mastitis subclinical

Fátima Arteaga¹, Ernesto Hurtado² y Hugo Dueñas¹

RESUMEN

Con fines de mejorar el estado sanitario de la glándula mamaria en vacas mestizas afectadas con mastitis subclínica, se evaluaron los extractos comerciales de oleo resina de ajo, *Allium sativum* (A) y oleo resina orégano, *Oreganum vulgare* (O) administrados de manera intramamaria. Antes de su aplicación los extractos se diluyeron en glicerol en relación 1:10. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, cada cuarto de la glándula mamaria constituyó una repetición. Los tratamientos fueron: T1= 3 mL A + 1 mL O; T2= 3 mL O + 1 mL A; T3= 6 mL A + 1 mL O; T4= 6 mL O + 1 mL A, administrados con una cánula y jeringa intramamaria en cada cuarto. Se midió la concentración de bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, antes y después de la aplicación de los extractos. Los resultados obtenidos muestran que T3 redujo ($P \leq 0,05$) la concentración bacteriana para *Staphylococcus aureus* de 11,61 a 9,49 UFC mL⁻¹; mientras que T4 redujo ($P \leq 0,05$) de 15,11 a 14,18 UFC mL⁻¹ de *Escherichia coli*. Se concluye que hubo efecto reductor de los extractos utilizados contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Palabras clave: orégano, ajo, glándula mamaria, mastitis, bacterias.

ABSTRACT

For the purpose of improving the mammary gland health status in crossbred cows affected with subclinical mastitis, commercial extracts oleo resin garlic, *Allium sativum* (A) and oil oregano resin, *Oreganum vulgare* (O) administered intramammary way were evaluated. Before application extracts were diluted 1:10 in glycerol. The experiment was conducted under a completely randomized design with four replications, each quarter of the mammary gland was a repetition. The experiment was conducted under a completely randomized design with four replications, each quarter of the mammary gland was a repetition. The treatments were: T1 = 3 mL A + 1 mL O; T2 = 3 mL O + 1 mL A; T3 = 6 mL A + 1 mL O; T4 = 6 mL O + 1 mL A, administered with intramammary cannula and syringe into each quarter. The concentration of bacteria of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was measured before and after application of the extracts. The results show that T3 reduced ($P \leq 0.05$) for *Staphylococcus aureus* bacterial concentration of 11.61 to 9.49 UFC mL⁻¹, while T4 decreased ($P \leq 0.05$) from 15.11 to 14.18 UFC mL⁻¹ *Escherichia coli*. It was concluded that there was reducer effect of extracts used against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Key words: Oregano, garlic, mammary gland, mastitis, bacteria.

(*) Recibido: 23-11-2015

Aceptado: 30-06-2016

¹ Área Agropecuaria, Carrera Pecuaria, Escuela Superior Politécnica de Manabí Manuel Félix López, Calceta, Ecuador. huceduna29@hotmail.com.

² Programa Prometeo-Senescyt, Ecuador. ernestohurta@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la búsqueda de nuevos principios antimicrobianos que actúen en el control de microorganismos patógenos de manera bacteriostática o bactericida, en los principales microorganismos causantes de enfermedades, tanto en el hombre como en animales, es creciente. Existen algunos productos naturales que pueden ser tan eficientes, que han demostrado actividad antimicrobiana (Márquez *et al.* 2009), mientras que los producidos por síntesis química, además de su alto costo, causan daños al ambiente y a la salud pública (Bastos *et al.* 2011).

El ajo contiene por lo menos 33 compuestos azufrados, varias enzimas, 17 aminoácidos y algunos minerales que contribuyen a su actividad antimicrobiana. De todas las especies de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados, lo que le confiere actividad antimicrobiana potente (Bender y Bárcenas 2013). Uno de estos azufrados es la alicina que inhibe a más de 300 bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus polymyxa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Kumar y Jain 2010).

La importancia de la planta de orégano se refleja en el alto valor agregado que adquiere su aceite esencial por sus componentes químicos, como el Timol (67,51%) que le otorga múltiples propiedades antioxidantes, microbiológicas y conservantes de alimentos (Acevedo *et al.* 2013).

Armenteros *et al.* (2004) informaron que el uso indiscriminado de antibióticos ha dado lugar a la presencia de microorganismos menos susceptibles a su efecto antibacteriano, por lo que es una necesidad imperiosa la búsqueda de compuestos, que por su contenido de antimicrobianos y antioxidantes permitan un tratamiento efectivo de la mastitis.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de ajo y orégano frente a una patología de alta prevalencia, busca reducir el uso de antibióticos en el tratamiento de mastitis subclínica, y de esa manera obtener un producto de

calidad e inocuidad para el consumidor (Hanafi *et al.* 2010).

El objetivo planteado en la presente investigación fue evaluar los extractos de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) administrados de manera intramamaria como inhibitorio de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, causales de la mastitis subclínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron cuatro vacas mestizas criollas, en fase de lactancia tardía (200 a 300 días), en condiciones similares de ambiente y manejo; con patología de mastitis subclínica, la cual fue detectada mediante pH de la leche, la prueba California Mastitis Test (CMT) y concentración de bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Recolección y evaluación de las muestras

Antes de la toma de las muestras, se rechazaron los primeros dos o tres chorros de leche, luego se frotó cada pezón por unos segundos con algodón impregnado de alcohol al 70%. Finalmente la leche se recolectó de cada cuarto en recipientes estériles. Las muestras se procesaron en el laboratorio de microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

Para evaluar la condición de las glándulas mamarias se determinó en las muestras de leche pH, prevalencia de mastitis subclínica mediante la prueba CMT y calificación de la prueba de CMT.

El proceso de identificación de las bacterias antes y después de la aplicación de los extractos en el caso de *Staphylococcus aureus*, consistió en purificar la bacteria en el medio de cultivo específico Agar Manithol Salt. Además, se realizó la prueba de la catalasa con la finalidad de confirmar *Staphylococcus*; para esto, a la colonia purificada que estaba en la caja Petri, se le agregó una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno al 3% y se observó la formación inmediata de burbujas (catalasa positiva) (MacFaddin 2003). Mientras que para la identificación de *Escherichia coli*, se realizó una suspensión en 5 ml de solución salina (1% de NaCl) de una colonia aislada del

microorganismo, a la cual se le aplicó el sistema de multipruebas (API 20E), cuya técnica consta 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados y una base de datos. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados (BioMérieux 2010). La lectura de los resultados se realizó por comparación de los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura.

En el aislamiento de *Staphylococcus aureus*, se empleó Agar Mannitol Salt Phenol. En su preparación se colocaron 108 g en 1000 ml de agua destilada, se utilizó el método de dilución múltiple 1:10000, la siembra se realizó colocando 1 mL de la dilución (10^4) en las cajas de Petri, posteriormente se incubaron en una estufa por 72 horas a 37 °C. Mientras que para la *Escherichia coli* se empleó 50 g Agar Mc Conkey en 1000 ml de agua destilada, el método de dilución múltiple 1:1000000 fue utilizado, con la siembra de 1 mL de la dilución (10^6) en las cajas de Petri (Harrigan y McCance 2014), estas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C.

La concentración microbiana se determinó a través del número de colonias bacterianas contenidas en cada una de las cajas de Petri, usando el contador de colonias (marca Senna, modelo: SC6). Los datos se expresaron de la siguiente manera: N de unidades formadoras de colonias (UFC), multiplicadas por 10x, donde x representa la respectiva dilución, según la norma INEN 1529-14.

Mientras que para las cajas de Petri que no presentaron crecimiento bacteriano, los resultados se expresaron como recuento estimado de bacterias ($<$) 1,0 multiplicado por el respectivo factor de dilución, según la norma INEN 1529-7.

Obtención de los extractos

Los extractos de *Allium sativum* y *Oreganum vulgare* fueron obtenidos de manera comercial (oleo resina de ajo y oleo resina de orégano), fabricados por la empresa "ACAY" y originarios de la India. Las concentraciones de los extractos según Tecnaal son las siguientes: aceite volátil de orégano con 20% y oleo resina de ajo con 0,28%. Los extractos se diluyeron en proporción 1: 10 en

glicerol que es un conservante, y se mezcló uniformemente.

Aplicación y descripción de los tratamientos

Con la ayuda de una cánula intramamaria de Instrumental Laura, calibre 12 por 3 pulgadas y una jeringa, se aplicaron en una ocasión los extractos en cada cuarto infectado, por un lapso de tres días consecutivos, según las concentraciones que se describen:

T1, consistió en una solución de 3 mL de oleo resina de ajo + 1 mL oleo resina de orégano (A3+O1). **T2**, 3mL de oleo resina de orégano + 1 mL oleo resina de ajo (O3+A1). **T3**, 6 mL de oleo resina de ajo + 1 mL oleo resina de orégano (A6+O1). **T4**, 6 mL de oleo resina de orégano + 1 mL oleo resina de ajo (O6+A1).

Finalmente, al cuarto día las muestras de leche tomadas de cada cuarto fueron trasladadas al laboratorio y sometidas a las pruebas referidas, para la identificación, aislamiento y concentración de los microorganismos.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de comparación de promedios entre la cantidad de bacterias antes y después de la aplicación de los extractos a través de prueba de T para muestras pareadas o relacionadas, utilizando el software InfoStat versión 2010, del Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuatro cuartos mamarios en estudio presentaron mastitis subclínica, de acuerdo con la prueba de CMT (Tabla 1). El pH fue 6,72 en todos los casos. Estos resultados coinciden con los reportados por Carrión (2008) quien informó que un pH entre 6,6 y 6,8 de la leche es condición de algún grado de mastitis. Así mismo, Alviar (2002) manifestó que el pH de la leche está comprendido entre 6,5 y 6,6. Por otro lado, valores de pH 6,7 a 7,5 son medidos en leches mastíticas debido a un aumento de la permeabilidad de las membranas de la glándula mamaria que origina una mayor

concentración de iones Na y Cl y una reducción del contenido de lactosa y de P inorgánico soluble (Alais y Godina 1985). Lo planteado por la literatura y los resultados obtenidos permiten inferir que el pH promedio de 6,7 es un indicador de presencia de mastitis.

Tabla 1. Prueba de CMT aplicadas en los cuartos mamarios de las vacas

CUARTOS MAMARIOS	UNIDAD BOVINA			
	6733	186	124	792
C.A.I.	++	++	++	++
C.A.D	++	++	++	++
C.P.I	++	++	++	++
C.P.D	++	++	++	++
C.A.I. Cuarto anterior izquierdo				
C.A.D. Cuarto anterior derecho				
C.P.I. Cuarto posterior izquierdo				
C.P.D. Cuarto posterior derecho				

Límites de calificación de la prueba de CMT: Coágulos definidos (+); Formación de una masa definida (++); Formación de una masa fuerte (+++)

En la Tabla 2 se presenta el efecto de la aplicación de los extractos sobre el número de UFC de *Staphylococcus aureus* en cuartos mamarios de vacas. Se observó que solamente la solución A6+O1 causó diferencias entre la cantidad de UFC encontrada antes y después de la aplicación de los tratamientos. Esto demuestra que aplicación de la solución con mayor concentración de ajo y baja en orégano ocasiona más eficiencia en la reducción de esta bacteria.

Tabla 2. Efecto de la aplicación de los extractos sobre el número de UFC de *Staphylococcus aureus* en leche de vacas.

Tratamientos	Promedios y error estándar (UFC mL ⁻¹)		
	Antes	Después	Valor de P
A3+O1	10,45±0,32	9,81±0,44	0,085 ^{ns}
O3+A1	10,9 ±0,45	9,91±0,64	0,097 ^{ns}
A6+O1	11,61±0,61	10,19±0,86	0,002*
O6+A1	10,59±0,75	9,71±0,23	0,098 ^{ns}

*significativo al 5%
Ns: No significativo

Moscoso (2011) señaló que la aplicación del ajo en concentración alta disminuye la carga microbiana en la leche de una manera más eficiente. Así mismo, García y Herrera (2007) mencionaron que el ajo también posee efecto bactericida frente a bacterias Gram (+), lo cual coincide con los resultados encontrados. Mientras que Bastos *et al.* (2011) demostraron que el orégano también posee efecto inhibitorio frente a bacterias Gram (+) como *Staphylococcus aureus* en leche de vacas.

El efecto de la aplicación de los extractos bajo estudio sobre el número de UFC de *Escherichia coli* resultó significativo (Tabla 3) para el T4; mientras que los otros tratamientos no presentaron diferencias. Esto demuestra que la aplicación de O6+A1 mL fue el más eficiente en la disminución de *Escherichia coli*, posiblemente el contenido de fenol, carvanol y timol en el orégano causó reducción en la presencia de la bacteria.

Tabla 3. Efecto de la aplicación los extractos sobre el número de UFC de *Escherichia coli* en leche de vacas.

Tratamientos	Promedio y error estándar (UFC mL ⁻¹)		
	Antes	Después	Valor de P
A3+O1	15,66±0,79	14,58±0,58	0,056 ^{ns}
O3+A1	15,36±0,33	13,81±0,45	0,06 ^{ns}
A6+O1	16,65±0,67	14,50±0,88	0,059 ^{ns}
O6+A1	15,11±0,66	11,18±0,91	0,003*

*significativo al 5%
Ns: No significativo

Estos resultados son similares a los encontrados por Rodríguez (2011), quien informó que el orégano por su composición química posee los niveles más altos de actividad bacteriana frente a microorganismos Gram (-) como *Escherichia coli*. Sin embargo, los resultados del presente trabajo difieren de los obtenidos por Lachowicz *et al.* (1998), quienes no encontraron acción específica de los extractos entre las cepas Gram (-) y Gram (+).

CONCLUSIÓN

Los extractos de *Allium sativum* y *Origanum vulgare* en combinación asociativa presentaron un efecto reductor en la concentración de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por lo que su uso es una alternativa factible para el control de la mastitis subclínica.

REFERENCIAS

- Acevedo, D., Navarro, M. y Monroy, L. 2013. Composición Química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). Información tecnológica 24(4): 43-48.
- Alais, C. y Godina, A. 1985. Ciencia de la leche: principios de técnica lechera. Reverté. S. A. Reimpresión 2003. Barcelona. 873 p.

- Alviar, J. 2002. Manual de Agropecuario de Técnicas orgánicas de la granja integral auto-suficiente. Editorial Limerin. Bogotá-Colombia. pp 83-102.
- Armenteros, M., Monte de Oca, N. y Ginorio, C. 2004. Estudio de la actividad antimicrobiana in vitro y en un modelo "ex vivo" de un extracto acuoso obtenido de la corteza de *Rhizophora mangle* L. frente a los principales patógenos productores de la mastitis bovina. [Revista en línea]. En: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080804.html>. [febrero de 2016].
- Bastos, M., Dame, L., Sousa, L., Almeida, D., Alves, M. y Braga, J. 2011. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Cubana de Plantas Medicinales 16(3):260 – 266.
- Bender, D. y Bárcenas, M. 2013. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7 – 1: 25 – 36.
- BioMérieux. 2010. Sistemas Miniaturizados API. [Manual en línea]. En: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_anexo2.pdf. [febrero del 2016].
- Carrión, A. 2008. Influencia de los diferentes grados de mastitis sobre el porcentaje de materia grasa, densidad, acidez, ph y reductasa de leche receptada en lácteos San Antonio. Tesis en Ingeniería de Industrias Pecuarias. EPOCH. Chimborazo-Riobamba, EC. p 48.
- García, R. y Herrera, A. 2007. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extracto acuoso de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar in vitro. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 5: 68 – 79.
- Hanafi, E., Danial, E. and El Razik, K. 2010. *Origanum vulgare* could be a novel antimycotic agent for treatment of mycotic mastitis in goat. International Journal of Academic Research 2 (4): 307- 313.
- Harrigan, W. and McCance, M. 2014. Laboratory methods in microbiology. Academic Press. Londres. 343 p.
- Kumar, R. and Jain, P. 2010. Antimicrobial activity of *Allium sativum* ethanolic extract against food associated bacteria and fungi. Drug Invention Today 2(4): 229-232.
- Lachowicz, K., Jones, G., Briggs, D., Bienvenu, F., Wan, J., Wilcock, A. and Coventry, M. 1998. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. Letters in Applied Microbiology 26(3): 209-214.
- MacFaddin, J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 851p.
- Márquez, D., Galeano, E. y Martínez, A. 2009. Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte II. Vitae 11(1): 35-41.
- Moscoso, J. 2011. Evaluación de diferentes concentraciones de tintura de ajo como sellador de ubres post ordeño para mejorar la calidad de la leche en cuatro fincas de la parroquia Ingapirca de la Provincia del Cañar. Tesis. Ing. Zootecnista. ESPOCH. Riobamba-Ecuador. 214 p.
- Rodríguez, E. 2011. Uso de agentes microbianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable 7: 153 - 170.