

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Evaluación de la capacidad antimicrobiana de dos productos naturales, el ajo y la miel

Avaliación da capacidade antimicrobiana de dous produtos naturais, o allo e a mel

Evaluation of antimicrobial activity of two natural products, garlic and honey



Alba Gegunde Díaz

Septiembre, 2016

Tutora académica: M^a Concepción Herrero López

Índice

Resumen	0
Resumo	0
Abstract	0
1. Introducción	1
2. Objetivo	3
3. Materiales y métodos	4
3.1 Descripción de los microorganismos empleados.....	4
3.2 Descripción del medio de cultivo.....	8
3.3 Preparación del extracto acuoso de ajo	8
3.4 Preparación del extracto acuoso de miel	9
3.5 Determinación del crecimiento microbiano: medida de densidad óptica.....	9
3.6 Diseño experimental	9
3.7 Análisis de datos	10
4. Resultados	11
4.1 Efecto de los extractos en medio sólido TSA	11
4.2 Efecto de los extractos acuosos en medio líquido TSB	11
5. Discusión	19
6. Conclusiones	21
Conclusiones	21
Conclusions	21
Bibliografía	23



El presente trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Herrero López, Catedrática de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Resumen:

El empleo de plantas medicinales con fines curativos se lleva a cabo desde tiempos inmemoriales. El ajo (*Allium sativum*) es quizá de los bulbos más conocidos en la antigüedad por sus propiedades curativas y ha adquirido una larga reputación como un agente medicinal terapéutico. La miel es otro producto natural con notables propiedades medicinales. Sus propiedades varían en función de diversos factores. Estas propiedades han sido el motivo para realizar este estudio y comprobar el efecto antimicrobiano de estos dos productos en diferentes tipos de microorganismos. Los resultados muestran que el ajo tiene un efecto antibiótico notable en las cepas estudiadas, mientras que la miel no muestra un efecto significativo en el crecimiento de las mismas.

Palabras clave: ajo, miel, microorganismo, antimicrobiano, crecimiento.

Resumo:

O emprego de plantas medicinais con fins curativos lévase a cabo dende tempos inmemoriais. O allo (*Allium sativum*) é quizáis dos bulbos máis coñecidos na antigüidade polas suas propiedades curativas e adquiriu unha longa reputación como axente medicinal terapéutico. O mel e outro produto natural con notables propiedades medicinais. As súas propiedades varían en función de diversos factores. Estas propiedades foron o motivo para realizar este estudio e comprobar o efecto antimicrobiano destes dous produtos en diferentes tipos de microorganismos. Os resultados mostran que o allo ten un efecto antibiótico notable nas cepas estudiadas, mentras que o mel non mostra un efecto significativo no crecemento das mesmas.

Palabras clave: allo, mel, microorganismo, antimicrobiano, crecemento.

Abstract:

The use of medicinal herbs has been reported since immemorial times. Garlic (*Allium sativum*) is one of the best known bulbs in the antiquity for its healthy properties and it has acquired a great reputation as a medicinal agent. Honey is another product with important medicinal properties. Its properties vary depending on different factors. Taking into account these properties, the antimicrobial activity of these two products was assayed against different microorganisms. Results obtained show a remarkable antimicrobial effect of garlic extract against all the microorganisms assayed, whereas honey did not show any effect against them.

Key words: garlic, honey, microorganism, antimicrobial, growth.

1. Introducción

Existe una gran tendencia a asociar a los microorganismos con la patogenicidad y la virulencia que puedan tener; es decir, con la capacidad de producir enfermedades en los huéspedes que infectan.

Pero lo cierto es que la gran mayoría de los microorganismos son inocuos e incluso beneficiosos para otros organismos.

Cuando hablamos de microorganismos patógenos, es importante tener en cuenta los agentes quimioterapéuticos disponibles para su tratamiento y eliminación. Las sulfonamidas, descubiertas por Dogmak en 1932, fueron las primeras sustancias eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en el ser humano, siendo un bactericida comparable a los antibióticos de amplio espectro. Teniendo en cuenta el concepto de antibiótico (producto del metabolismo microbiano que mata o inhibe el crecimiento de otros microorganismos), el primer antibiótico propiamente dicho fue la penicilina, descubierta por Alexander Fleming en 1928.

No obstante, el empleo de plantas medicinales con fines curativos se lleva a cabo desde tiempos inmemoriales, siendo el único recurso del que se podía disponer en la antigüedad. El uso medicinal de las plantas recibe el nombre de fitoterapia

El ajo (*Allium sativum*) es quizá de los bulbos más conocidos en la antigüedad por sus propiedades curativas y por su característico olor (el cual se debe a una mezcla de principios activos). El ajo crece durante todo el año, su tamaño depende de la especie y del lugar de procedencia. Las propiedades antibacterianas del ajo fueron reconocidas por Louis Pasteur y, durante la Segunda Guerra Mundial, se utilizó el ajo como un antiséptico en la prevención de la gangrena (Afzal *et al.*, 2000). El ajo ha adquirido así una larga reputación como un agente medicinal terapéutico.

El ajo ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones por sus propiedades anti-cancerígenas, anti-trombóticas, anti-arteroescleróticas, anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-microbianas (Colín-González *et al.*, 2012). Esta última propiedad es en la que nos vamos a centrar en este estudio.

El compuesto activo que se encuentra en el ajo es la alicina (S-Alil-2-propentiosulfonato). Aunque muchos beneficios se pueden obtener directamente de la alicina, su inestabilidad requiere prácticas de preparación adecuadas para el consumo. La estructura química de la alicina es la responsable de su inestabilidad, la que hace que sea sensible a la reactividad. La alicina sólo se comporta como un compuesto biológicamente activo cuando el ajo se tritura o se corta, de forma que la enzima alinasa reacciona con el compuesto aliina, obteniéndose como producto de esta reacción la alicina (Frankel *et al.*, 2015).

Otro producto natural con notables propiedades medicinales es la miel. Se trata de una sustancia alimenticia natural producida por la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.). Es un producto biológico de composición compleja y diversa, variando sus

caracteres en función de su procedencia, las plantas que han proporcionado el néctar, el procedimiento de extracción, etc.

Se compone principalmente de azúcares y otros componentes tales como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales y sustancias aromáticas. Es rico en flavonoides y ácidos fenólicos que exhiben una amplia gama de efectos biológicos y actúan como antioxidantes naturales (Alqarni *et al.*, 2012). La composición, el color, el aroma y el sabor de la miel dependen principalmente de las flores, regiones geográficas, especies de clima y de abejas que intervienen en su producción, y también se ven afectados por las condiciones meteorológicas, procesamiento, manipulación, envasado y tiempo de almacenamiento (Escuredo *et al.*, 2014 y Tornuk *et al.*, 2013).

2. Objetivo

El objetivo general del presente trabajo, es el estudio de los posibles efectos antimicrobianos de dos productos naturales, como son el ajo y la miel.

Se analiza el efecto de distintas concentraciones de estos productos naturales sobre el crecimiento de varias especies de microorganismos de distintos grupos y cuyas características difieren en gran medida.

3. Materiales y métodos

3.1 Descripción de los microorganismos empleados

Se han utilizado seis microorganismos diferentes, cinco bacterias y una levadura: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Micrococcus lutetus*, *Mycobacterium phlei* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Escherichia coli (Fig.1)

Dominio: *Bacteria*

Reino: *Bacteria*

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

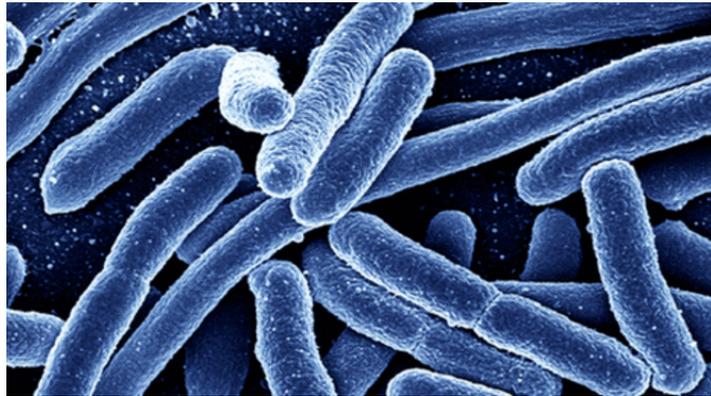


Figura 1: Células de *Escherichia coli*.
(Fuente: <http://www.bbc.com/news/health-13639241>)

Sin duda alguna es la bacteria mejor estudiada y el microorganismo de experimentación elegido en muchos casos. Es un bacilo gram-negativo que forma parte de la microbiota entérica normal del colon humano y de otros animales homeotermos, y resulta bastante útil para determinar la presencia de contaminación fecal. Es un organismo facultativo que puede presentar un crecimiento aerobio o anaerobio (Willey *et al.*, 2008).

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas. Sin embargo, sí que existen unas cuantas cepas potencialmente patógenas que se transmiten por alimentos. Todas estas cepas son patógenos intestinales y varias de ellas se caracterizan por su capacidad de producir enterotoxinas muy potentes. Existen unas 200 cepas conocidas de *E. coli*. Algunas causan enfermedades diarreicas graves e infecciones del tracto urinario. (Madigan *et al.*, 2009).

Staphylococcus aureus (Fig.2)

Dominio: *Bacteria*
Reino: *Bacteria*
Filo: *Firmicutes*
Clase: *Bacilli*
Orden: *Bacillales*
Familia: *Staphylococcaceae*
Género: *Staphylococcus*
Especie: *Staphylococcus aureus*

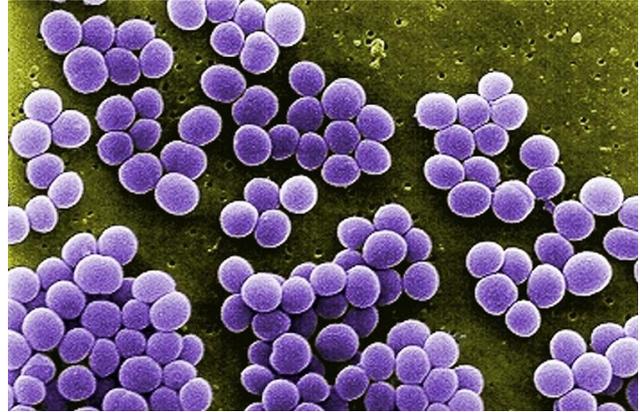


Figura 2: células de *Staphylococcus aureus*. (Fuente: <http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html>)

Es un coco gram-positivo que se disponen en forma de racimos que se dividen en varios planos. Forman colonias amarillas y son anaerobios facultativos, es decir, que crecen mediante respiración aeróbica o bien por fermentación con producción de ácido láctico. (Madigan *et al.*, 2015)

Es una causa importante de la bacteriemia, que con frecuencia da lugar a infecciones secundarias graves, tales como endocarditis infecciosa, osteomielitis y artritis séptica. La capacidad de *S. aureus* para causar una amplia gama de infecciones, se ha atribuido a su enorme arsenal de diferentes factores de virulencia (Painter *et al.*, 2014).

Salmonella sp. (Fig. 3)

Dominio: *Bacteria*
Reino: *Bacteria*
Filo: *Proteobacteria*.
Clase: *Gammaproteobacteria*
Orden: *Enterobacteriales*
Familia: *Enterobacteriaceae*
Género: *Salmonella*
Especie: *Salmonella sp.*

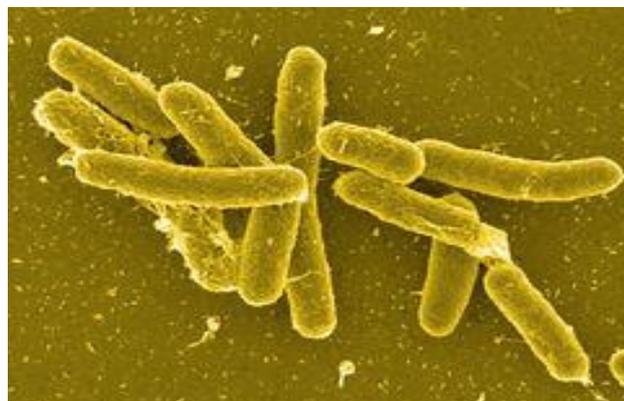


Figura 3: células de *Salmonella sp.* (Fuente: <http://www.wales.nhs.uk/sites3/page.cfm?orgid=457&pid=48023#a>)

Se trata de enterobacterias bacilares y gram-negativas, que son anaerobios facultativos. Son bacterias productoras de ácido sulfhídrico (H₂S) que emplean la glucosa como fuente de nutrientes (Willey *et al.*, 2008).

Estructuralmente constan de flagelos peritricos y no desarrollan cápsula ni esporas. (Madigan *et al.*, 2015).

Es un huésped habitual de los intestinos de cualquier animal homeotermo. Es un agente productor de zoonosis, que normalmente se transmite por contacto directo, en el procesado de alimentos o por vía sexual (Willey *et al.*, 2008).

Staphylococcus aureus puede causar diversas formas de infecciones subclínicas y clínicas en seres humanos y animales. Estas bacterias son capaces de producir una gran variedad de factores de virulencia (Fijalkowski *et al.*, 2008).

Micrococcus luteus (Fig. 4)

Dominio: *Bacteria*

Reino: *Bacteria*

Filo: *Actinobacteria*

Clase: *Actinobacteria*

Orden: *Actinomycetales*

Familia: *Micrococcaceae*

Género: *Micrococcus*

Especie: *Micrococcus luteus*

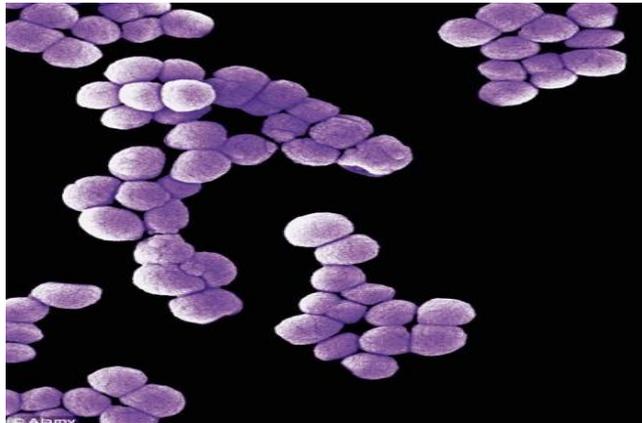


Figura 4: células de *Micrococcus luteus*. (Fuente: <http://www.dailymail.co.uk/home/you/article-2788036/why-learn-love-bacteria-s-time-easy-antibac-spray.html>)

Es un coco gram-positivo y aerobio estricto que oxida hidratos de carbono y agua a CO₂ y que no produce ácido a partir de glucosa (Madigan, *et al.*, 2015).

M. luteus se puede encontrar en diversos hábitats, tales como la piel humana, el agua, el polvo o en el suelo. Fue aislado por primera vez por Alexander Fleming en 1929 (Ganz *et al.*, 2003). Generalmente se considera una bacteria inofensiva, aunque ha habido algunos casos de infecciones de *Micrococcus* en personas inmunocomprometidas (Madigan *et al.*, 2015).

Tiene algunas características en común con *S. aureus*, tales como la morfología y color de las colonias (Madigan *et al.*, 2015).

Mycobacterium phlei (Fig.5)

Dominio: *Bacteria*

Reino: *Bacteria*

Filo: *Actinobacteria*

Orden: *Actinomycetales*

Familia: *Mycobacteriaceae*

Género: *Mycobacterium*

Especie: *Mycobacterium phlei*



Figura 5: células de *Mycobacterium phlei*. (Fuente: <http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000gThDOnFb2c8>)

Fue nombrada por Lehmann y Neumann en 1899 (Gordon *et al.* 1953).

Se trata de un bacilo aerobio e inmóvil no esporulador . Es ácido-alcohol resistente, carece de cápsula. (Murray *et al.*, 2015).

Al igual que el resto de las micobacterias, posee una pared celular característica de éste género; más gruesa que la de la mayoría de las bacterias, cerosa y rica en ácidos micólicos (Murray *et al.*, 2015).

Esta pared celular se compone de peptidoglicano (PG) unido con con arabinogalactano (AG), y ácidos micólicos. La capa más externa consiste en una variedad de forma no covalente de glucolípidos, polisacáridos, lipoglucanos y proteínas, incluyendo las proteínas formadoras de poros (Kaur *et al.*, 2009)

Saccharomyces cerevisiae (Fig.6)

Dominio: Eukarya

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Saccharomyces*

Especie: *Saccharomyces cerevisiae*

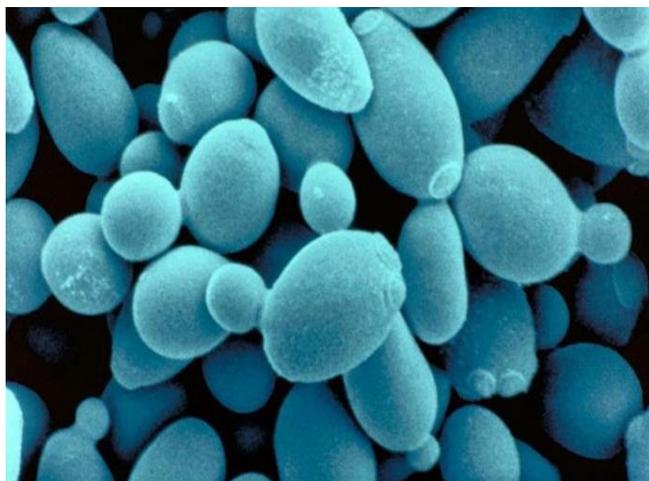


Figura 6: Células de *Saccharomyces cerevisiae*. (Fuente: <https://www.emaze.com/@AZZLOWO/fermentaci%C3%B3n>)

Es un microorganismo eucariota. Es una levadura de color amarillo-verdoso con forma globular. La mayoría de las veces se encuentra en las zonas donde puede producirse la fermentación, como la de la superficie de la fruta, bodegas de almacenamiento y en los equipos utilizados durante el proceso de fermentación (Mortimer, 2000) aunque también aparece en la superficie de plantas, tractos gastrointestinales y superficies corporales de insectos y animales de sangre caliente, también en suelos de todo el mundo e incluso en ambientes acuático (Madigan *et al.*, 2015).

S. cerevisiae también es considerado un “organismo modelo” por los científicos, debido a que es un organismo unicelular y eucariota. Como eucariota, la mayoría de los genes de la levadura y las proteínas tienen homólogos en humanos (Morsomme *et al.*, 1996), y por tanto, una mayor comprensión del genoma de la levadura ayudaría a comprender mejor el genoma humano. Otra ventaja es su rapidez en el crecimiento.

3.2 Descripción del medio de cultivo

En todos los casos se utilizó para el cultivo de los microorganismos el medio de cultivo de tripticasa y soja (Tabla 1). Este (medio de digerido de soja y caseína) es un medio para enriquecimiento de uso general utilizado en procedimientos cualitativos para la prueba de esterilidad y para el enriquecimiento y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes en exceso. En la microbiología clínica, puede utilizarse para la suspensión, el enriquecimiento y el cultivo de cepas aisladas en otros medios. Se ha utilizado tanto en forma sólida (TSA = tripticasa soja agar) como líquida (TSB = tripticasa soja caldo).

Tabla 1: Composición de TSB pra un volumen final de 1 litro de caldo de cultivo.
(Fuente: Scharlab, S.L.)

Composición de TSB (1L)	
Componente	Cantidad
Caseína	17 g
Peptona de soja	3 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g

3.3 Preparación del extracto acuoso de ajo

Para la preparación del extracto acuoso del ajo se partió de 50 g de ajo previamente pelado, a los que se le añadieron 100 ml de agua destilada que actuará como diluyente.

Se colocan ambos componentes en una bolsa que introducimos en un homogenizador Stomacher, el cual se pone a funcionar a alta potencia durante 6 minutos.

Una vez que tenemos el ajo homogeneizado en el agua se procede a centrifugar a 4500 rpm durante 15 min y a 4°C. Una vez centrifugado, obtenemos el sobrenadante y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones para eliminar los restos que pudieran haber quedado, completando así la obtención del extracto de ajo que ya está listo para ser utilizado.

3.4 Preparación del extracto acuoso de miel

Partimos de 50 g de miel, los cuales serán diluidos en 50 ml de agua destilada. Se homogeniza la mezcla hasta que tiene un aspecto totalmente homogéneo.

3.5 Determinación del crecimiento microbiano: medida de densidad óptica

El método escogido para determinar el crecimiento de los microorganismos fue la medida de densidad óptica (expresada como 100-Transmitancia), para lo que se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb). Para ello se utilizaron cultivos en medio TSB realizados en tubos de ensayo de 18 x 150 mm con 3 ml de medio de cultivo. La densidad óptica (como transmitancia) se midió a 530nm de longitud de onda, siempre frente a un blanco. Los blancos fueron diferentes para las distintas concentraciones de cada compuesto ensayado; para cada concentración de cada uno de los compuestos se utilizó como blanco una solución que contenía la cantidad de medio de cultivo y de extracto correspondiente en cada caso sin inocular, es decir, libre de microorganismos.

3.6 Diseño experimental

Se utilizaron placas de TSA para determinar la producción de halos de inhibición utilizando discos impregnados con el extracto acuoso de la sustancia a ensayar (ajo o miel). Se preparan discos impregnados en los extractos acuosos. A continuación, se realiza una siembra en césped de cada uno de los microorganismos. Para ello, se toman inóculos procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento. A continuación se incuban durante 48 horas a 37°C, excepto la levadura *S. cerevisiae* que se incubaba a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación se observa la presencia o no de halo de inhibición.

Para cuantificar el efecto sobre el crecimiento se realizan cultivos en medio líquido (TSB). Los cultivos se realizaron en tubos 18 x 150 mm con 3 ml de medio. Se prepararon tubos con 3 ml de TSB a los que se añadieron 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μ l de cada extracto, quedando las siguientes concentraciones: 0, 4, 178, 25, 33, 42 y 50 mg/ml. El tubo sin adición de extracto actúa como control (0). Se preparan tres tubos de cada concentración y del blanco. Cada tubo se inocula con el microorganismo correspondiente, para lo que se utilizan cultivos en fase exponencial de crecimiento. Todos los cultivos se incuban a 37° C durante 48h, excepto *S. cerevisiae* que se incubó a 30° C. Durante este periodo de incubación se determinó el crecimiento a las 24h y a las 48h, midiendo la densidad óptica como se ha descrito anteriormente. Cada ensayo se realiza por triplicado.

3.7 Análisis de datos

Todos los datos obtenidos fueron analizados para comprobar que se cumplieren los requisitos de homogeneidad de la varianza y normalidad para realizar los test paramétricos.

Los valores obtenidos de las EC₅₀ para cada especie y para cada tiempo (24 y 48 horas) fueron comparados a través de análisis de varianza de un factor (ANOVA), en la que el factor principal fue la especie. Cuando el ANOVA fue significativo, se realizó una prueba post hoc de test de Tukey para determinar qué medias difieren entre sí y con respecto al control.

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa IBM SPSS Statistic 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUU)

El nivel de significación aceptado fue el de un p-valor <0,05.

4. Resultados

4.1 Efecto de los extractos en medio sólido TSA

Las placas sembradas y tratadas con el extracto de ajo han mostrado inhibición en los cultivos de todos los microorganismos. En las placas sembradas con extracto de miel, a pesar de la existencia de halo inhibitorio, éste es mucho más sutil (Fig. 7).



Figura 7: Resultado de la siembra en placa con los discos de extracto de ajo.
(Fuente: Alba Gegunde)

Se aprecia un halo de inhibición notable alrededor del disco (derecha) en comparación con la placa control (izquierda) en la que no existe halo de inhibición.

4.2 Efecto de los extractos acuosos en medio líquido TSB

4.2.1 Efecto del extracto de ajo sobre el crecimiento de los diferentes microorganismos

- *E. coli*

La adición de distintas concentraciones de extracto de ajo al medio de cultivo, inhibió significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de *E. coli* con todas las concentraciones ensayadas (Fig. 8) tanto a las 24h como a las 48h de cultivo.

Los resultados del test ANOVA muestran diferencias significativas a las 24 horas en las muestras tratadas con extracto con respecto a la muestra control. El test Tukey establece que la concentración mínima a la que se producen diferencias significativas con respecto al control es de 4 mg/ml de extracto de ajo.

A las 48 horas también existen diferencias significativas de crecimiento con respecto al control. El test de Tukey establece que la concentración mínima a la que se produce una diferencia significativa del crecimiento con respecto al control es de 8 mg/ml.

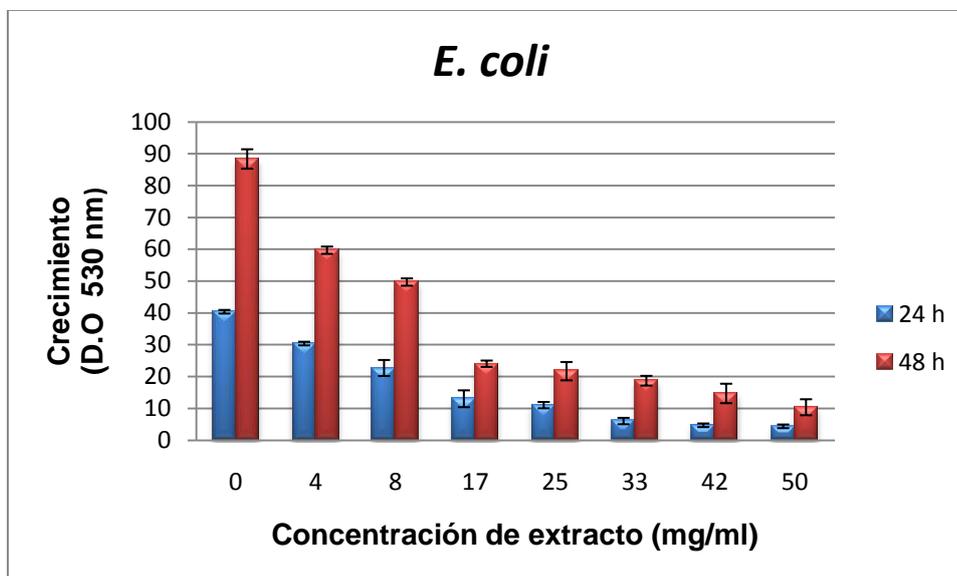


Figura 8: Crecimiento celular de *E.coli* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

Se elaboró una recta dosis-respuesta del efecto del extracto de ajo sobre el crecimiento de *E. coli* en la que se representa el porcentaje de inhibición del crecimiento, en relación a un control sin extracto, frente al logaritmo de la concentración del extracto a las 24h y a las 48h. La recta de concentración-respuesta obtenida en base a la tasa de crecimiento de los cultivos presenta una respuesta de tipo lineal (Figuras 9 y 10). Mediante la correspondiente ecuación se calculó el valor de la EC_{50} , es decir, la concentración de extracto que provoca una respuesta a mitad de camino entre la línea base (la inexistencia de inhibición en este caso) y la respuesta máxima (la inhibición total).

La EC_{50} fue calculada para las 24 y a las 48 horas. El valor obtenido para esta EC_{50} fue 7,40 mg/ml a las 24h y 7,34 mg/ml a las 48h.

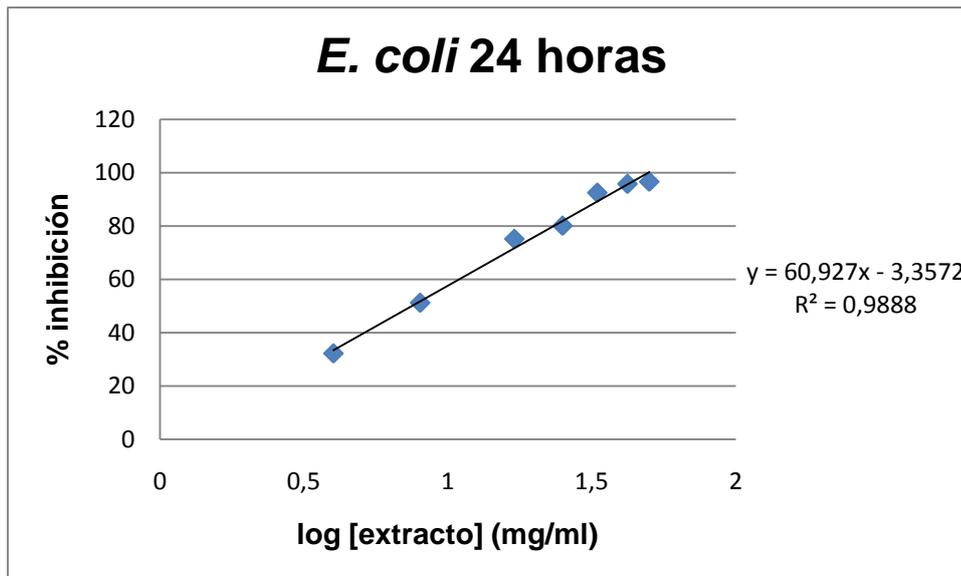


Figura 9: Recta dosis-respuesta del % de inhibición del crecimiento en el cultivo frente al logaritmo de la concentración de extracto de ajo de *E. coli* a las 24 horas.

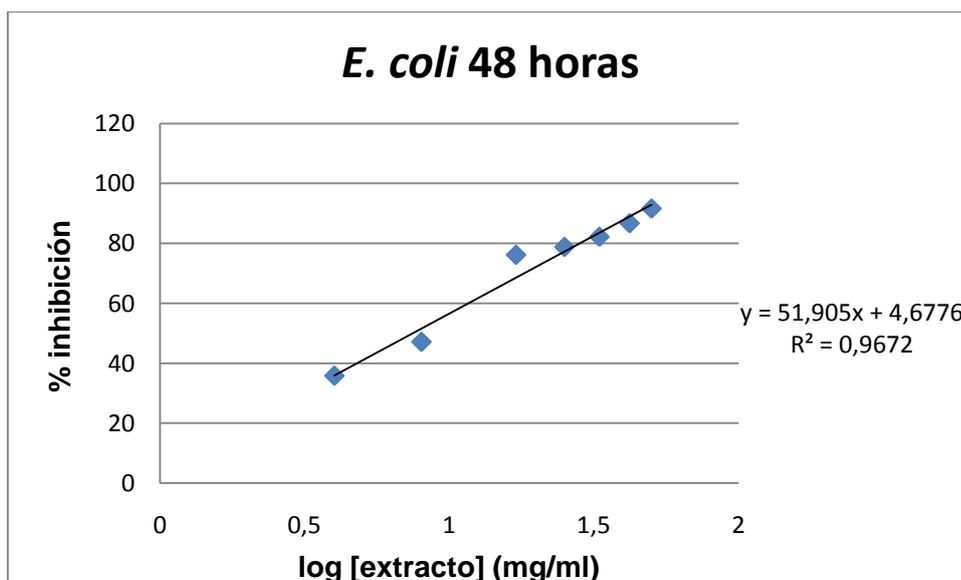


Figura 10: Recta dosis-respuesta del % de inhibición del crecimiento en el cultivo frente al logaritmo de la concentración de extracto de ajo de *E. coli* a las 48 horas.

- ***S. aureus***

La adición de distintas concentraciones de extracto de ajo al medio de cultivo, inhibió significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento de *S. aureus* con todas las concentraciones ensayadas (Fig. 11) tanto a las 24h como a las 48h de cultivo.

El test ANOVA muestra diferencias significativas a las 24 horas en las muestras tratadas con extracto con respecto a la muestra control. El test Tukey establece que la concentración mínima a la que se producen diferencias significativas con respecto al control es de 4 mg/ml de extracto de ajo.

A las 48 horas también existen diferencias significativas de crecimiento con respecto al control. El test de Tukey establece que la concentración mínima a la que se produce una diferencia significativa del crecimiento con respecto al control es de 4 mg/ml.

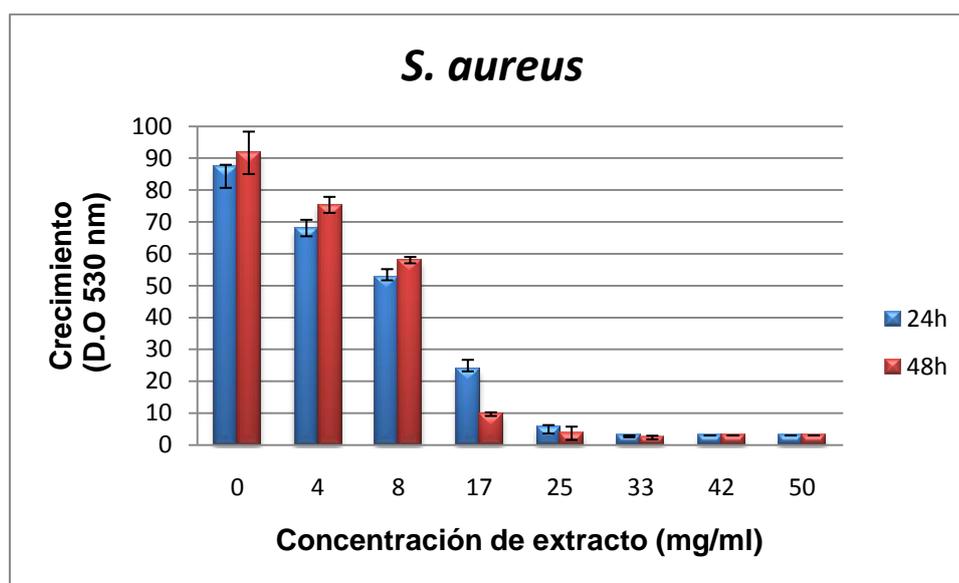


Figura 11: Crecimiento de *S. aureus* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

Al igual que en caso anterior se hicieron las curvas dosis-respuesta y se calculó el valor de la EC_{50} a las 24 y a las 48 horas, y en este caso el resultado fue de 8,37 mg/ml a las 24 horas y de 8,27 mg/ml a las 48 horas.

- *Salmonella sp.*

La adición de distintas concentraciones de extracto de ajo al medio de cultivo, inhibió significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento del microorganismo con todas las concentraciones ensayadas (Fig. 12) tanto a las 24h como a las 48h de cultivo; el test ANOVA corrobora estas diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento de los cultivos tratados con extracto con respecto a la muestra control, tanto a las 24 como a las 48 horas. El test de Tukey muestra que la concentración de extracto a la que producen diferencias significativas con respecto al control es de 4 mg/ml en los dos tiempos medidos (24 y 48 horas).

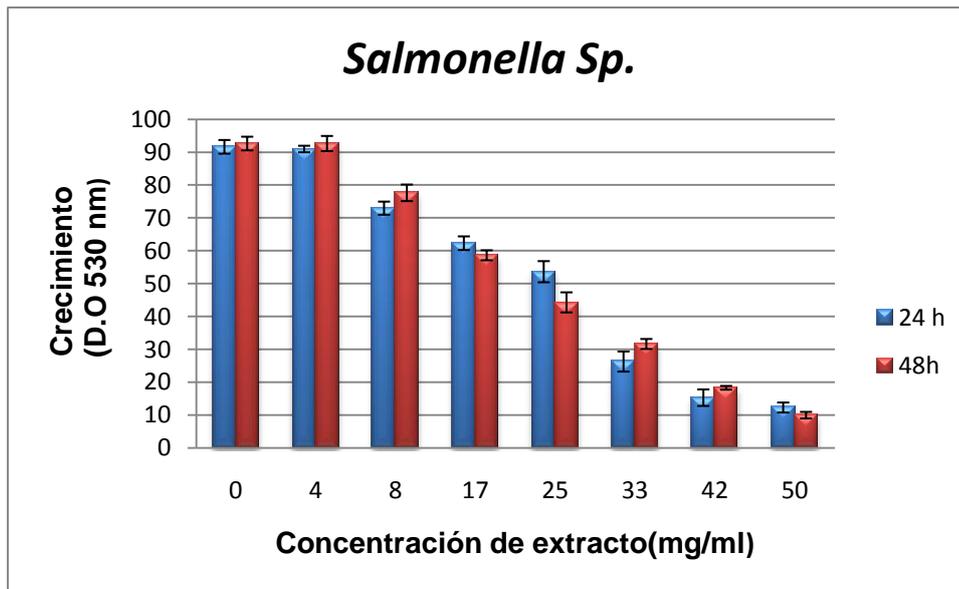


Figura 12: Crecimiento de *Salmonella sp.* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

Los resultados de EC_{50} *Salmonella sp.* son de 18,19 mg/ml a las 24 horas de incubación y de 17,88 mg/ml a las 48 horas.

- *Mycobacterium phlei*

El test ANOVA para *M. phlei* mostró diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos tratados con extracto de ajo a las 24 y a las 48 horas (Fig. 13). El test de Tukey determinó que 4mg/ml es la concentración mínima a la que se producen diferencias significativas en el crecimiento de *M. phlei*, pero sin embargo, a las 48 horas, éste valor se eleva hasta los 17 mg/ml.

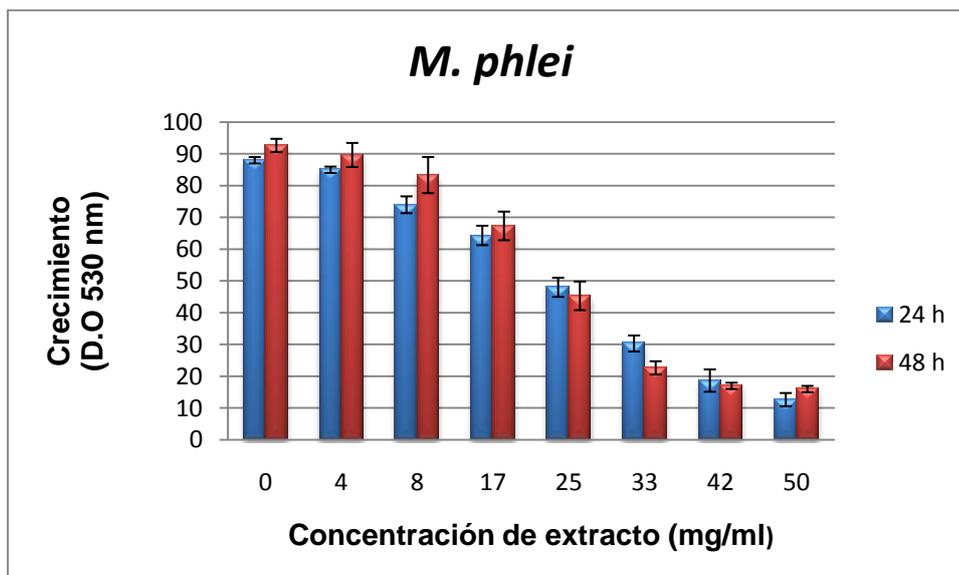


Figura 13: Crecimiento de *Mycobacterium phlei* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

En este microorganismo, el valor de la EC_{50} a las 24 horas es de 19,64 mg/ml y a las 48 horas de 18,86 mg/ml.

- ***M. luteus***

En este caso, de nuevo, existen diferencias significativas para las mediciones de crecimiento en ambos tiempos de incubación (24 y 48 horas) (Fig. 13). Cuando se realiza el test de Tukey para ver cuáles son las concentraciones mínimas que provocan diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos tratados con extracto con respecto al control, éste concluye que, para las 24 y las 48 horas dicha concentración fue de 4 mg/ml.

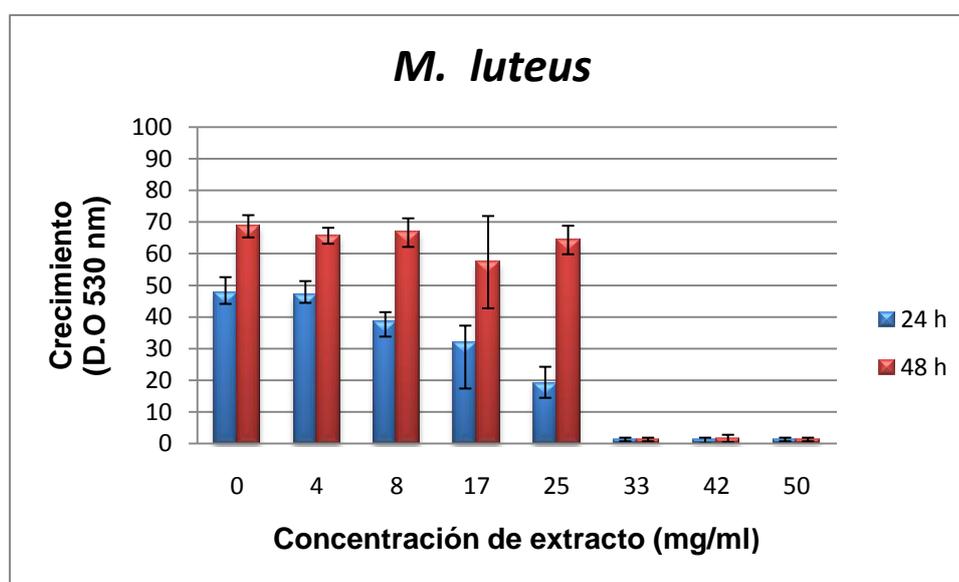


Figura 13: Crecimiento de *M. luteus* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

Los valores de EC_{50} obtenidos, fueron de 8,03 mg/ml a las 24 horas y de 7,53 mg/ml a las 48 horas.

- ***S. cerevisiae***

En el caso de esta levadura, al igual que en el resto de microorganismos vistos anteriormente, se observan diferencias significativas (Fig. 14) en el crecimiento de las muestras contenientes de extracto de ajo con respecto a la muestra tomada como control tras la realización del test ANOVA. Una vez que se realiza el test Tukey, se observa que 4mg/ml es la concentración mínima a la cual se producen dichas diferencias significativas en los dos tiempos medidos (24 y 48 horas).

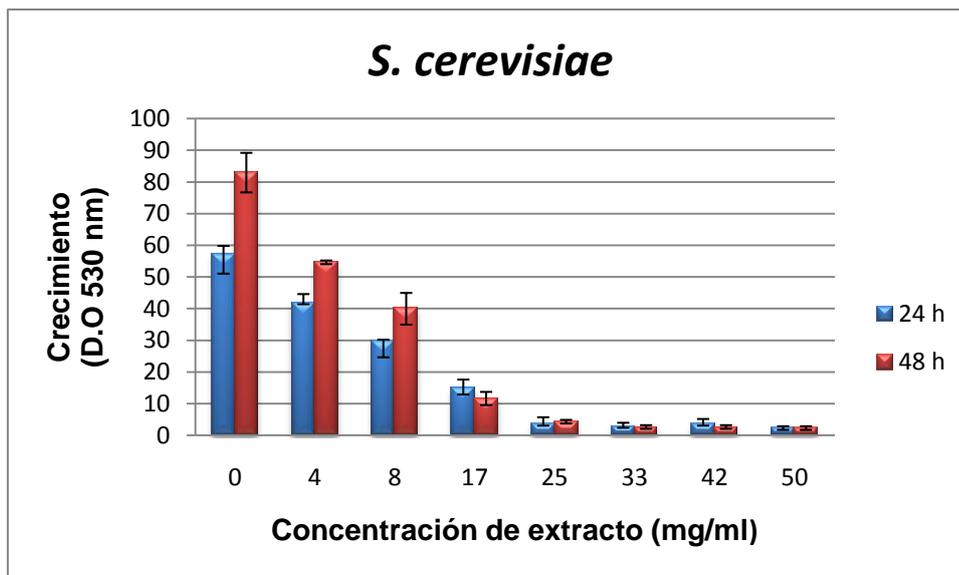


Figura 14: Crecimiento de *S. cerevisiae* con diferentes concentraciones de extracto de ajo medido a las 24 y a las 48 horas.

El valor de EC_{50} a las 24 horas es de 7,19 mg/ml y a las 48 horas de 5,86 mg/ml.

4.2.2 Efecto del extracto acuoso de miel en los diferentes microorganismos

Tras los pobres resultados obtenidos con los halos de inhibición en medio sólido, solo se ensayaron las distintas concentraciones del extracto de miel frente a una bacteria gram-negativa (*E. coli*) y una gram-positiva (*S. aureus*).

La adición de las concentraciones de extracto de miel al medio de cultivo no afectó al crecimiento de *E. coli* ni tampoco al de *S. aureus* (Fig. 15 y 16). Los resultados del ANOVA no muestran diferencias significativas entre los crecimientos de los cultivos tratados con respecto al control, por lo que el extracto de miel no inhibe el crecimiento de *E. coli*. Es más, se observa (Fig.15) un mayor crecimiento a medida que se incrementa la concentración de extracto. Esto se puede atribuir a la elevada concentración en azúcares de la miel, que aportan nutrientes extra y favorecen el crecimiento de las bacterias.

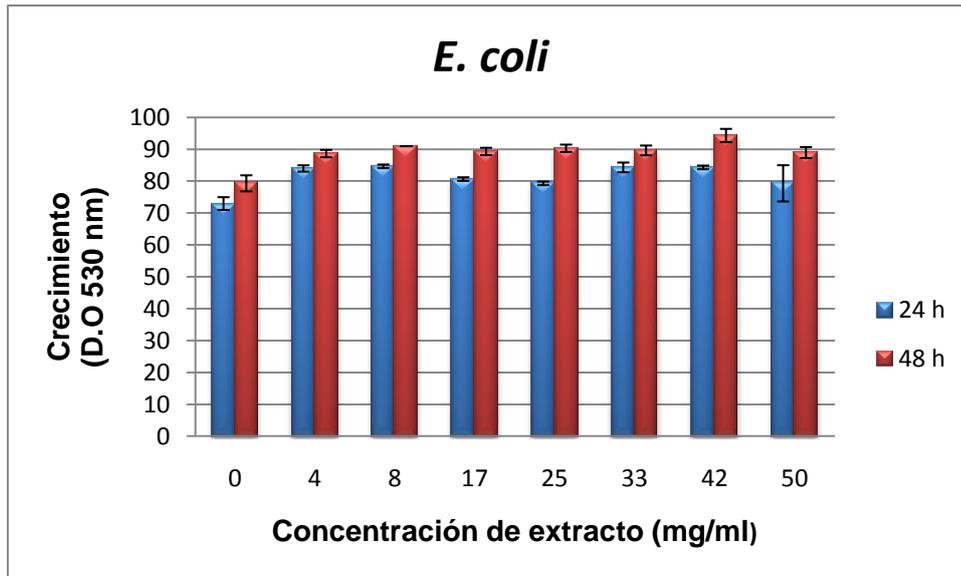


Figura 15: Crecimiento de *E. coli* con diferentes concentraciones de extracto de miel. medido a las 24 y a las 48 horas.

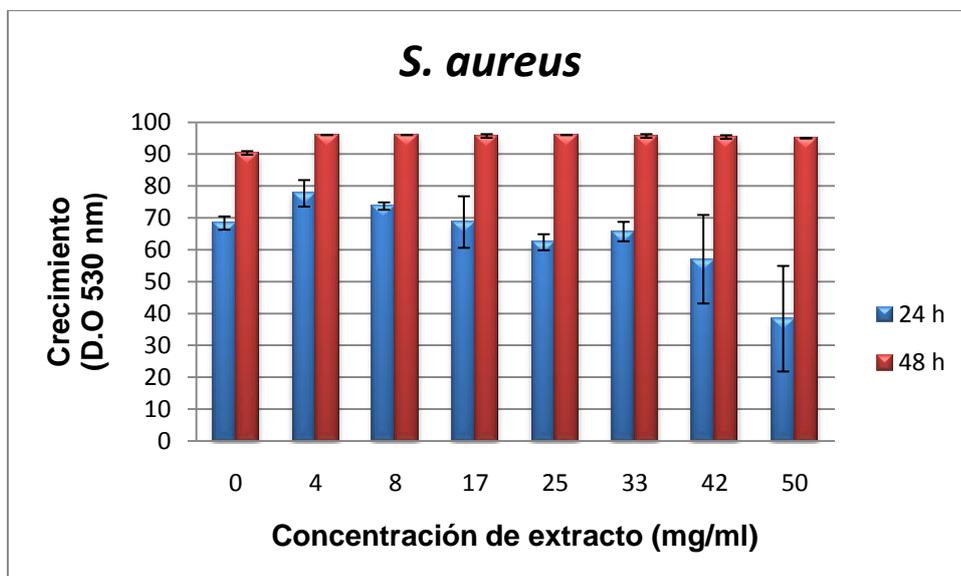


Figura 16: Crecimiento de *S. aureus* con diferentes concentraciones de extracto de miel. medido a las 24 y a las 48 horas.

5. Discusión

Las diferentes especies bacterianas y la levadura mostraron una sensibilidad variable al extracto acuoso de ajo. En *S. aureus*, *Salmonella sp.*, *M.luteus* y *S. cerevisiae* la concentración mínima que produce cambios significativos en el crecimiento fue de 4 mg/ml. En *E. coli* la concentración mínima a la que se produce inhibición es también 4 mg/ml a las 24 horas, sin embargo a las 48 horas es de 8 mg/ml. En el caso de *M. phlei* la concentración mínima a la que se producen diferencias significativas en el crecimiento es de 4 mg/ml, sin embargo a las 48 horas, esta concentración se eleva hasta los 17 mg/ml.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente se observa que, el extracto de ajo presenta un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas, así como micobacterias y levaduras. Esta hipótesis se ve respaldada por estudios anteriores llevados a cabo aplicando extracto de ajo a diferentes microorganismos. En el año 1999, Ankri & Mirelman llevaron a cabo una investigación en la que comprobaron el efecto antimicrobiano del ajo en distintos microorganismos, entre los que se encontraban especies de *Escherichia*, *Salmonella* y *Staphylococcus*, observando que, el ajo tenía un notable efecto antibiótico en todas las bacterias anteriormente descritas. Curiosamente, varias cepas bacterianas resistentes a algunos antibióticos, tal como es el caso de *Staphylococcus aureus* y su resistencia a la meticilina, o *E.coli* y su resistencia a varios fármacos, tuvieron una elevada sensibilidad al componente del ajo denominado “alicina”.

Además, en 2006, Indu *et al.*, también obtuvieron unos resultados positivos en cuanto a la actividad antibacteriana del ajo en *E. coli*.

Los valores de EC50 en *E. coli* y en *S. aureus* son similares, estos resultados concuerdan con los de otras investigaciones anteriores (Ankri & Mirelman, 1999), donde la concentración de alicina necesaria para matar a los individuos en ambos microorganismos fue muy similar, lo que indica que la sensibilidad al ajo de ambos microorganismos es muy similar, a pesar de las diferencias estructurales de su pared celular.

Mycobacterium , a las 24 horas tiene una alta sensibilidad al extracto de ajo, en cambio, a las 48 horas el valor de concentración mínimo que produce diferencias significativas en el crecimiento es más elevado. Esto podría deberse a la composición de su pared celular, que tiene un alto contenido en ácidos micólicos. El ajo es considerado como una de las fuentes vegetales más ricas en compuestos fenólicos (Martins *et al.*,2016), lo que implica que tendría dificultades para penetrar en la pared ácido alcohol resistente de *M. phlei*.

En cuanto a la levadura, en *S. cerevisiae* se observa un gran efecto del extracto de ajo sobre el crecimiento de ésta (la concentración de extracto más baja que provoca diferencias significativas en el crecimiento con respecto al control es de 4 mg/ml en los dos tiempos medidos). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que relacionaron este microorganismo con el ajo. En 1996, Naganawa *et al.*, estudiaron los efectos de un componente concreto presente en el ajo, el ajoene, en

diferentes tipos de microorganismos, entre los cuales se encontraba *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos de dicho estudio determinaron la inhibición en el crecimiento de *S. cerevisiae* a concentraciones de 30 µg/ml. Este mismo estudio de Naganawa *et al.* Incluye otros microorganismos, como es el caso de *Micrococcus luteus*. Este microorganismo se inhibía a concentraciones de 136 µg/ml de ajoene. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el que los resultados muestran una menor efectividad del ajo en el *Micrococcus* que en la levadura.

En el caso de la miel, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control en ninguna de las concentraciones de extracto de miel administradas a los cultivos de los microorganismos. En el año 2007, Basualdo *et al.*, realizaron un estudio sobre la comparación de la actividad antibacteriana de la miel contra diferentes bacterias y obtuvieron que, en algunos de los microorganismos estudiados, entre los que se encontraban *S. aureus* y *E. coli*, todas las muestras a las que se les aplicó miel sin diluir producen la inhibición del crecimiento. En cambio, cuando se aplica la miel diluida, no se observa inhibición del crecimiento bacteriano. La dilución de la miel podría explicar la ausencia de inhibición en las muestras de este estudio. Además, el efecto antimicrobiano de la miel sin diluir podría explicarse por la alta concentración de azúcares presentes en la miel; es decir, que no es que exista la producción de sustancias antimicrobianas, si no que el efecto puede ser debido a un choque osmótico a causa de la elevada concentración de azúcares. En el año 2010, Rahman *et al.*, obtuvieron resultados de efecto antimicrobiano de la miel en *S. aureus*, pero estos efectos eran producidos a concentraciones muy altas de extracto de miel (370 mg/ml), reforzándose la hipótesis de que la inhibición puede ser debida a la gran concentración de azúcares.

6. Conclusiones

1. El extracto de ajo presentó una actividad antimicrobiana de amplio espectro, teniendo efecto inhibitorio en todos los tipos de microorganismos estudiados: dos bacterias gram positivas, dos gram negativas, una micobacteria y una levadura.

2. El extracto de miel no presentó actividad antimicrobiana de ningún tipo en los microorganismos de estudio.

Conclusión

1. O extracto de alho amosou unha actividade antimicrobiana de amplo espectro, tendo efecto inhibitorio en todos os tipos de microorganismos estudados: dúas bacterias gram positivas, dúas gram negativas, una micobacteria e una levadura.

2. O extracto de mel non presentou actividade antimicrobiana de ningún tipo nos microorganismos de estudo.

Conclusions

1. Garlic extract showed broad-spectrum antimicrobial activity, showing inhibitory effect on the growth of all of the microorganisms assayed: two gram-positive bacteria, two gram-negative bacteria, one mycobacteria and one yeast.

2. Honey extract did not show antimicrobial activity on the growth of any of the microorganisms assayed.

Bibliografía

- ❖ Afzal, M.; Ali, M.; Thomson, M.; Armstrong, D. (2000). Garlic and its medicinal potential. *Inflammo Pharmacology*. 8: 123-148.
- ❖ Alqarni, A.S. ; Owayss, A.A. ; Mahmoud, A.A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*. 5: 618–625.
- ❖ Ankri, S.; Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1: 125-129.
- ❖ Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M. S., & Marioli, J. M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124: 375-381.
- ❖ Colín-González, A.L.; Santana, R.A.; Silva-Islas, C.A.; Chánez-Cárdenas, M.E.; Perla, D.M. (2012). The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract and S-Allylcysteine-Induced protection. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012: 16-32
- ❖ Escuredo, O.; Dobre, I. ; Fernández-González, M. ; Seijo, M.C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*. 149: 84–90.
- ❖ Fijalkowski, K.; Czernomysy-Furowicz, D.; Irwin, J. A.; Nawrotek, P.; Pobucewicz, A. (2012). Secretory virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates obtained from mastitic bovine milk—effect on bovine polymorphonuclear neutrophils. *Research in Veterinary Science*. 93: 82-87.
- ❖ Frankel, F.; Priven, M.; Richard, E.; Schweinshault, C.; Tongo, O.; Webster, A.; Barth, E.; Slejzer, K.; Edelstein, S. (2015). Health functionality of organosulfides: a review. *International Journal of Food Properties*. 19: 537-548.
- ❖ Ganz, T.; Gabayan, V.; Liao, H. I.; Liu, L.; Oren, A.; Graf, T.; Cole, A. M. (2003). Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan. *Blood*. 101: 2388-2392.
- ❖ Gordon, R. E.; Smith, M. M. (1953). RAPIDLY GROWING, ACID FAST BACTERIA I.: Species' descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann. *Journal of Bacteriology*. 66: 8-41.

- ❖ Indu, M.N.; Hatha, A.A.M.; Abirosh, C.; Harsha, U.; Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 153-158
- ❖ Kaur, D.; Guerin, M. E.; Škovierová, H.; Brennan, P. J.; Jackson, M. (2009). Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology*. 69: 23-78.
- ❖ Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D. H.; Stahl, D.A. (2015). Brock. Biología de los Microorganismos. 14ª ed. Ed. Pearson. Madrid. 1136 pp
- ❖ Martins, N.; Petropoulos, S.; Ferreira, I. C. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*. 211: 41-50.
- ❖ Morsomme, P., de Kerchove d'Exaerde, A., De Meester, S., Thines, D., Goffeau, A., & Boutry, M. (1996). Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H (+)-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H (+)-pumping and permit yeast growth at low pH. *The EMBO Journal*. 15: 5513-5526.
- ❖ Mortimer, R. K. (2000). Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*. 10: 403-409.
- ❖ Murray, P.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. (2015). *Microbiología Médica*. Elsevier Saunders. 235pp.
- ❖ Naganawa, R.; Iwata, N.; Ishikawa, K.; Fukuda, H.; Fujino, T.; Suzuki, A. (1996). Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4238-4242.
- ❖ Painter, K.L.; Krishna, A.; Wigneshweraraj, S.; Edwards, A.M. (2014). What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia?. *Trends in Microbiology*. 22: 676-685.
- ❖ Rahman, M.M.; Richardson, A.; Sofian-Azirun, M. (2010). Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 4: 1872-1878.
- ❖ Tornuk, F.; Karaman, S.; Ozturk, I.; Toker, O.S.; Tastemur, B.; Sagdic, O. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*. 46: 124–131.

- ❖ Willey, J.M.; Sherwood, L.M.; Woolverton, C.J. (2008). Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª Ed. Ed. McGrawHill. Madrid. 1124 pp.

Enlaces Web

❖ <http://www.bacteriainphotos.com/Staphylococcus%20aureus%20electron%20microscopy.html> - Consultado por última vez el 10/06/2016

❖ <http://www.bbc.com/news/health-13639241>- Consultado por última vez el 22/07/2016

❖ <http://www.dailymail.co.uk/home/you/article-2788036/why-learn-love-bacteria-s-time-easy-antibac-spray.html>- Consultado por última vez el 30/01/2016

❖ <https://www.emaze.com/@AZZLOWO/fermentaci%C3%B3n> - Consultado por última vez el 06/2/2016

❖ <http://www.visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000gThDOnFb2c8>- Consultado por última vez el 19/05/2016

❖ <http://www.wales.nhs.uk/sites3/page.cfm?orgid=457&pid=48023#a> - Consultado por última vez 12/06/2016