

EFFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DE LOS FRUCTANOS DE AGAVE FRENTE A *Listeria monocytogenes*

Guillen Torres Luis Enrique (1), Franco Robles Elena (2)

¹ [Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato] | [le.guillentorres@ugto.mx]

² [Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [e.francorobles@ugto.mx]

Resumen

En la actualidad, diversas son las bacterias que han generado resistencia a una amplia variedad de antibióticos; bacterias con un importante interés clínico pues poseen un elevado grado de patogenicidad, tal es el caso de *Listeria monocytogenes* un microorganismo capaz, no solo de ocasionar enfermedades gastrointestinales, sino que en casos más severos puede ser letal. Por dicha razón, en la actualidad se buscan nuevas alternativas en su mayoría de origen natural, con la finalidad de detener la multiresistencia a los productos químicos. En este estudio evaluamos el efecto de los Fructanos de Agave sobre *L. monocytogenes* mediante la inhibición del crecimiento *in vitro*. Los resultados demuestran que existe una inhibición estadísticamente significativa respecto al control negativo de los fructanos al 10% y 20% (389.8193 ± 12.30 y 656.5929 ± 0.00 , respectivamente; $p < 0.01$). Los fructanos de agave tienen efecto antibacteriano frente a *L. monocytogenes*, por lo que se sugiere como una alternativa para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por esta bacteria.

Abstract

Currently, there are several bacteria that have generated resistance to a wide variety of antibiotics; bacteria with an important clinical interest because they have a high degree of pathogenicity, such is the case of *Listeria monocytogenes* a microorganism capable not only of causing gastrointestinal diseases, but in more severe cases can be lethal. For this reason, currently new alternatives are sought, mostly of natural origin, with the purpose of stopping the multiresistance to chemical products. In this study we evaluated the effect of Agave fructans on *L. monocytogenes* by inhibiting *in vitro* growth. The results show that there is a statistically significant inhibition with respect to the negative control of 10% and 20% fructans (389.8193 ± 12.30 and 656.5929 ± 0.00 , respectively, $p < 0.01$). Agave fructans have antibacterial effect against *L. monocytogenes*, so it is suggested as an alternative for the treatment of infections caused by this bacterium.

PALABRAS CLAVE

Fructanos de Agave; *Listeria monocytogenes*; antimicrobiano.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de que algunas bacterias se volvieran selectivas y resistentes a ciertos antibióticos, comenzó a ser considerada décadas posteriores al descubrimiento de los antimicrobianos, pues la administración a bajas dosis y por largos periodos de tiempo, propiciaban las condiciones ideales para que esto ocurriera [1]. Por otra parte, la reciente perspectiva adoptada por la Organización Internacional de Salud Animal (OIE) en términos de “una sola salud”, busca prevenir y evitar la susceptibilidad que representa tanto para la salud pública como animal, el brote de nuevos patógenos multiresistentes [2]. Debido a lo anterior, actualmente se buscan nuevas alternativas que sustituyan a los antibióticos y que además mantengan el estado eubiótico de la microbiota intestinal, pues se ha demostrado que los antibióticos alteran el equilibrio ecológico del hospedero; lo que vuelve susceptibles a los animales para contraer más fácilmente enfermedades, asociadas a factores estresantes como malas condiciones ambientales, de manejo o nutricionales [3]. La enfermedad ocasionada por *L. monocytogenes*, es conocida como listeriosis, la cual después de la salmonelosis, se considera la segunda causa de un número importante de muertes en Estados Unidos y en Europa [4]. La infección puede ser de presentación no invasiva gastrointestinal, caracterizada por diarrea febril esporádica y dolores de cabeza; sin embargo, la forma invasiva se presenta cuando la bacteria sobrepasa la barrera intestinal, desde el lumen del intestino hasta las células epiteliales y endoteliales, donde se distribuye por el torrente sanguíneo y los ganglios linfáticos hacia el hígado y el bazo para posteriormente dispersarse al resto del organismo donde atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria, lo que puede ocasionar mortinatos, abortos, partos prematuros y en individuos inmunológicamente susceptibles provoca septicemias, meningitis y encefalitis [5][6].

Diversos estudios proponen el uso de los prebióticos como una alternativa natural para modular la microbiota, pues se trata de ingredientes alimenticios no digeribles por el hospedero, que estimulan el crecimiento selectivo y la actividad fermentativa de ciertas bacterias benéficas presentes en el colon [7][8]. Una vez

que estos carbohidratos indigeribles llegan al ciego, serán principalmente aprovechados por las bifidobacterias y lactobacilos quienes los fermentarán inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias patógenas como *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacterium*, *Salmonella*, entre otras [9].

Los fructanos son una clase de prebióticos; son compuestos formados por dos o más unidades de fructosa unidas mediante enlaces glucosídicos y que además suelen contener una molécula de glucosa en su estructura [10]. La estructura que posee la molécula de los fructanos del Agave, es de tipo ramificada contando con un grado de polimerización mayor al descrito en los fructanos procedentes de achicoria [11].

Por lo anterior, en este estudio proponemos que los fructanos de agave pueden actuar como antimicrobianos frente a *Listeria monocytogenes* considerada una bacteria patógena de importancia veterinaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Diagnóstico Clínico del Departamento de Veterinaria y Zootecnia, de la División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato. Dicho estudio descriptivo y experimental, se realizó *in vitro* por triplicado y en condiciones de ambiente controlado.

Para determinar la curva de crecimiento bacteriano, se realizó la lectura de densidad óptica mediante espectrofotómetro (Easy Kem Vet, Desego) a una longitud de onda de 620 nm. Para ello una noche previa a la lectura (12 a 14 horas), se preparó un pre-cultivo, sembrando una asada del cultivo inicial (placa de Petri) en 3 ml de caldo de soya tripticaseína (Fluka Analytical, 22092, Lot: BCBF7343V) y se dejó incubar a 37° C. una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 100 µl del pre-cultivo y se sembraron en otro tubo con 10 ml de caldo de soya tripticaseína (se repitió lo mismo para cada uno de los triplicados), posteriormente se dejó incubar durante una hora y media, y se inició la lectura de cada uno de los triplicados con intervalos de 30 minutos a partir de la primera lectura durante 9 horas.

La técnica de difusión de pozos se realizó de la manera siguiente. En un tubo falcón estéril de 50 ml, se mezclaron 20 ml de agar de pozos (a una temperatura aproximada de 40° C) y 115 µl del cultivo bacteriano con densidad óptica de 0.8 a 1.0, tomando como referencia la hora según la curva de crecimiento. La mezcla una vez homogénea se colocó en una caja de Petri estéril y posteriormente se dejó reposar a temperatura ambiente hasta solidificar bajo el calor de dos mecheros, en el agar solido se realizaron cinco pozos con un sacabocados de 8 mm de diámetro en cada caja, tres de ellos para el ensayo por triplicado, uno para el control positivo y otro para el control negativo. En cada pozo se colocaron 100 µl de solución y se evaluaron dos concentraciones diferentes de fructanos de agave disueltos en agua destilada: 10 y 20%, como control positivo se utilizó extracto de brócoli, y como control negativo agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron en la incubadora durante 24 h a 37° C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se observó la presencia de halos de inhibición y se realizó el cálculo del área mediante la siguiente formula:

$$AI = \left(\pi \left(\frac{d \text{ ext.}}{2} \right)^2 \right) - \left(\pi \left(\frac{d \text{ int.}}{2} \right)^2 \right)$$

AI = Área de inhibición (mm²)

$\pi = 3.1416$

d ext. = diámetro exterior (mm)

d int. = diámetro interior (mm)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la técnica de tinción de Gram se realizó la evaluación diferencial, comprobando la morfología celular y la característica a la tinción de la especie bacteriana (Imagen 1 y 2).

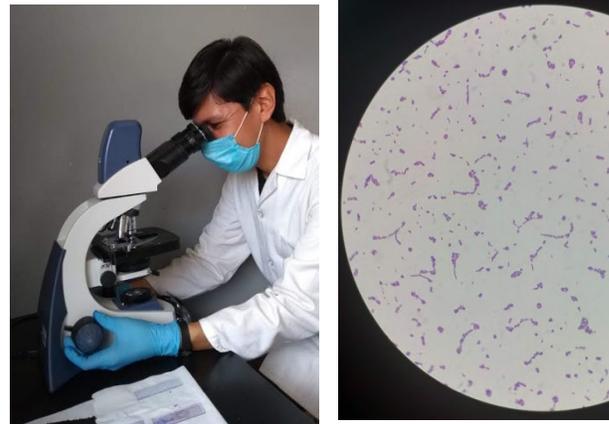


IMAGEN 1 y 2: Visualización al microscopio en objetivo de 100X del microorganismo a estudiar e identificación de bacilos Grampositivos, característicos de *Listeria monocytogenes*.

En la imagen 3 se muestra la tendencia de crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante nueve horas de incubación, mediante la lectura de densidad óptica por espectrofotometría

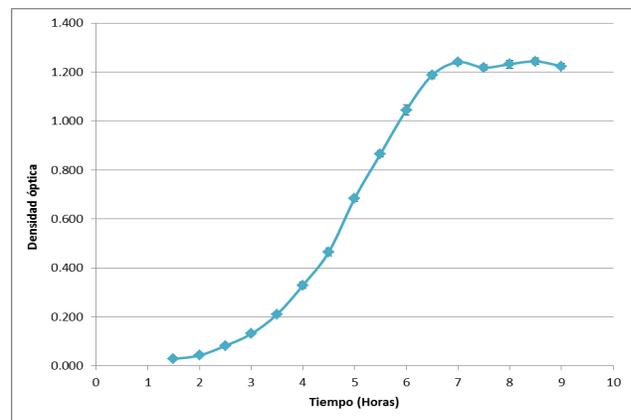


IMAGEN 3: Curva de crecimiento bacteriano *Listeria monocytogenes*.

A continuación, se muestran los de halos de inhibición formados por la inhibición de fructanos de agave al 10% y 20% (Imágenes 4 y 5).

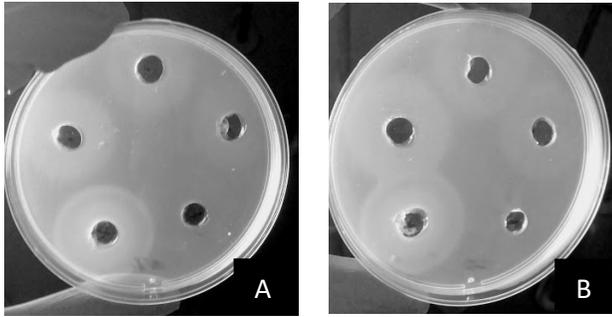


IMAGEN 4 y 5: Ensayo experimental *Listeria monocytogenes* contra Fructanos de Agave en concentración del 10%(A) y al 20%(B) por triplicado, utilizando extracto de brócoli como control positivo (pozo inf. izq.) y agua destilada estéril como control negativo (pozo inf. der.).

En la tabla 1 se muestra el área de inhibición promedio para cada concentración, el control positivo y el control negativo. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el área de inhibición de las concentraciones de 10%, 20%, el control positivo y el control negativo ($p < 0.01$).

Tabla 1: Área de inhibición de *L. monocytogenes* por fructanos de Agave.

Concentración	Área de inhibición (mm ²)
10%	389.8193 ± 12.30 ^a
20%	656.5929 ± 0.00 ^b
Control Positivo	753.9822 ± 0.00 ^c
Control Negativo	0.0000 ± 0.00 ^d

Los datos son representados como la media ± DS. Se realizó ANOVA de una vía con poshoc de Tukey. Las letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los fructanos de agave inhiben el crecimiento *in vitro* de *Listeria monocytogenes*, por lo que podrían considerarse una alternativa terapéutica para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por este microorganismo. Sin embargo, se sugiere realizar más estudios al respecto para conocer el mecanismo de esta inhibición.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Graciela Castro Escarpulli. Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Mieles Campos Azules S.A. de C.V., Jalisco.

M.C. Darío Pacheco Cano. Doctorado en Biociencias. Universidad de Guanajuato.

M.C. Erika Alejandra Martínez Ortega. Maestría en Biociencias. Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Cepero B. R. (2006). Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza: 1-46.
- [2] Giacoboni G. (2013). Resistencia a los antimicrobianos en medicina veterinaria y su relación con la salud pública. Información Veterinaria. Sitio argentino de Producción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires: 1-3.
- [3] Badia R. Lizardo R. Martínez P. & Brufau J. (2013). Oligosaccharide structure determines prebiotic role of β -galactomannan against Salmonella enterica ser. Typhimorium in vitro. *Gut Microbes*. 1(4): 72-75.
- [4] Paciell D. & Medina J. (2016). Enfermedad por *Listeria monocytogenes*. Minireview: Listeriosis Invasiva en adultos. Actualización. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República: 2-7
- [5] Sánchez A. B. & Palencia H. E. (2010). Infecciones por Listeria. *Medicine*. 10(50): 3368-3372.
- [6] Soto V. Z., Pérez L. L. & Estrada A. D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*. 32(1): 105-122.
- [7] García V. M. I. (2014). Efecto de los fructanos de Agave tequilana Weber var. azul en la absorción de calcio y calcificación de hueso. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México.
- [8] Olivera G. & González M. I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición*. 63(9): 482-494.
- [9] Morales K. D. & Vélez R. J. F. (2013). Prebióticos: su importancia en la salud humana y propiedades funcionales en tecnología de alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 1(7): 12-24.
- [10] Madrigal L. & Sangronis E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 4(57): 387-396.
- [11] Godínez H. C. I., Aguirre R. J. R., Juárez F. B. I., Ortiz P. M. D. & Becerra J. J. (2015). Extraction and characterization of Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 1(22): 59-72.