

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



*EFEECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE
EL CRECIMIENTO, LA ESPORULACION
Y LA PRODUCCION DE TOXINAS DE
Clostridium perfringens tipo A*

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.

P R E S E N T A

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

San Nicolás, N. L.

Mayo de 1997

TM

QR82

.B3

S2

c.1



1080080867



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION
DE TOXINAS DE *Clostridium perfringens* Tipo A

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

San Nicolas, N.L.

Mayo de 1997

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



EFFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE EL CRECIMIENTO, LA
ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE TOXINAS DE
Clostridium perfringens Tipo A

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

CESAR ALFREDO SANCHEZ GARCIA

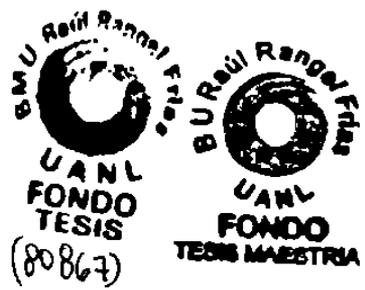
APROBADA
COMISION DE TESIS




Dr. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO
PRESIDENTE


Dra. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS
SECRETARIO


Dra. MARIA JULIA VERDE STAR
VOCAL



EFFECTO DE EXTRACTOS DE PLANTAS SOBRE EL
CRECIMIENTO, LA ESPORULACION Y LA PRODUCCION DE
TOXINAS DE *Clostridium perfringens* Tipo A

ESTE TRBAJO FUE RELIZADO BAJO LA DIRECCION DEL Dr. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO, LA ASESORIA DE LA Dra. NORMA LAURA HEREDIA ROJAS Y LA Dra. JULIA VERDE STAR; EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y GENETICA DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEON.

ESTA INVESTIGACION FORMO PARTE DEL PROYECTO TITULADO: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIENTEROTOXIGENICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) MEDIANTE EL CONVENIO CON LA U.A.N.L. No. 3996-N

*Un hombre exitoso es aquel que
recibe un gran trato de sus semejantes,
a menudo es incomparable,
y que además corresponde al servicio que presta.
El valor de un hombre, de cualquier manera,
debe verse en lo que dá,
y no en lo que es capaz de recibir.*

Albert Einstein

DEDICATORIA

A MIS PADRES: CÉSAR SÁNCHEZ ZUEZADA (+) Y ROSALINDA GARCÍA
GARZA POR QUIMARME EN EL MUNDO EXTERIOR
Y MOSTRAME LAS MARAVILLAS QUE ENCIERRA.

A MIS HERMANOS EDUARDO, ALBERTO E IRENEA POR LAS RISAS Y LOS
JUEGOS QUE ME AYUDARON A SEGUIR ADELANTE SIN IMPORTAR LO QUE
SUCEDIERA.

A LAS NIÑAS QUE DE UNA FORMA U OTRA TOCARON MI CORAZÓN
Y ME HICIERON LO QUE SOY.

POR ÚLTIMO A " THE DREAMER-MAKERS "

ZINENES COMO YO. SE HAN DESLIZADO ATRAVÉS DE UN ESPEJO.
LLEVAN UN REFLEJO EN LOS OJOS QUE LES OBLIGA A OCULTARLO TODO; PERO
CUANDO PIERDEN LO QUE OCULTAN Y YA NO ES POSIBLE CALLAR MAS.
DEBEN METIR PARA PROTEGER A LOS DEMÁS.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de esta investigación y la beca otorgada.

Al Dr. José Santos García Alvarado y a la Dra. Norma Laura Heredía Rojas por su asesoría, su tiempo su paciencia y sus enseñanzas.

A la Dra. Ma. Julia Verde Star por sus consejos, su apoyo incondicional y por mostrarme que siempre se puede hacer todo con una sonrisa.

A la M.C. Leticia Lozano Gonzalez por mostrarme que el mundo puede ser *visto de formas diferentes, por abrimos los ojos a nuevos retos y nuevas preguntas.*

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica y Genética de microorganismos por lo que me enseñaron en el tiempo que convivimos.

Al personal docente de la Facultad de Ciencias Biológicas que sembraron en mi un espíritu de lucha con el que se puede lograr todo en la vida usando tan solo bases científicas y por las facilidades prestadas para este trabajo.

A los Biólogos y Q.B.P. de 2º y 3º semestre de la facultad por hacer mis pocos ratos de ocio mas agradables y mostrarme otras formas de ver de la vida.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Página de Título	I
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Indice de Contenido	VII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tablas	XVII
Lista de Abreviaturas	XVIII
Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	6
<i>Clostridium perfringens</i>	6
Plantas como antimicrobianos empíricos	10
Efectos de extractos de plantas en el crecimiento bacteriano	11
Plantas como inhibidores de la formación de esporas y la producción de toxinas	16
Hipótesis	18
Objetivos	18
Material y Métodos	19
Plantas analizadas	19
Cepas usadas	19
Activación de cepas	20
Determinación del número de inóculo	20
Obtención de extractos	20
Determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de <i>C. perfringens</i>	21
Efecto de extractos sobre la producción de esporas	22
Efecto de extractos sobre la producción de enterotoxina	22
Producción de suero anti-enterotoxina	23
Detección de enterotoxina por contraimmunoelectroforesis	24
Efecto de extractos sobre la producción de fosfolipasa C (α toxina)	25
Cuantificación de la actividad de la fosfolipasa C	25

	Página
Resultados	27
Estandarización de los extractos.	27
Determinación del número de U.F.C. en el inóculo	28
Determinación de las CMI de <i>C. perfringens</i> en medio Müller-Hinton	29
Efecto de extractos de plantas en la formación de esporas	33
Efecto de extractos de plantas en la producción de enterotoxina	46
Efecto de extractos de plantas en la producción de fosfolipasa	47
Determinación de la CMI del control positivo	65
Discusión	66
Conclusiones	71
Literatura Citada	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1a: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8238 en medio Müller-Hinton.	30
Figura 1b: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8238 en medio Müller-Hinton	30
Figura 2a: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239 en medio Müller-Hinton.....	30
Figura 2b: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8239 en medio Müller-Hinton.....	30
Figura 3a: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8798 en medio Müller-Hinton	31
Figura 3b: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> NCTC 8798 en medio Müller-Hinton	31
Figura 4a: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> FD-1 en medio Müller-Hinton	31
Figura 4b: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> FD-1 en medio Müller-Hinton	31
Figura 5a: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624 en medio Müller-Hinton	32
Figura 5b: Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624 en medio Müller-Hinton	32

	Página
Figura 6: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	38
Figura 7: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	38
Figura 8: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	38
Figura 9: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	38
Figura 10: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	39
Figura 11: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	39
Figura 12: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	39
Figura 13: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	39
Figura 14: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	40
Figura 15: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	40
Figura 16: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	40
Figura 17: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	40
Figura 18: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	41
Figura 19: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	41

	Página
Figura 20: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	41
Figura 21: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de hojase sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	41
Figura 22: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de hojase sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	42
Figura 23: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de hojase sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	42
Figura 24: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de hojase sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	42
Figura 25: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de hojase sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	42
Figura 26: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	43
Figura 27: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	43
Figura 28: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	43
Figura 29: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	43
Figura 30: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	44
Figura 31: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	44
Figura 32: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	44
Figura 33: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	44

	Página
Figura 34: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> FD-1	45
Figura 35: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	45
Figura 36: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC	50
Figura 37: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	50
Figura 38: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC	50
Figura 39: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	50
Figura 40: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC	51
Figura 41: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	51
Figura 42: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	51
Figura 43: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	51
Figura 44: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC	52
Figura 45: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	52
Figura 46: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC	52
Figura 47: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	52

	Página
Figura 48: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC	53
Figura 49: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	53
Figura 50: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC	53
Figura 51: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	53
Figura 52: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	54
Figura 53: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	54
Figura 54: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC	54
Figura 55: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	54
Figura 56: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC	55
Figura 57: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	55
Figura 58: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC	55
Figura 59: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	55
Figura 60: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC	56
Figura 61: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	56

	Página
Figura 62: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	56
Figura 63: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	56
Figura 64: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC	57
Figura 65: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	57
Figura 66: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC	57
Figura 67: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	57
Figura 68: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC	58
Figura 69: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	58
Figura 70: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC	58
Figura 71: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	58
Figura 72: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	59
Figura 73: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	59
Figura 74: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC	59
Figura 75: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	59

	Página
Figura 76: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC ..	60
Figura 77: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	60
Figura 78: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC ..	60
Figura 79: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	60
Figura 80: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC ..	61
Figura 81: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	61
Figura 82: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	61
Figura 83: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	61
Figura 84: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC ..	62
Figura 85: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	62
Figura 86: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238 en medio ICC	62
Figura 87: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8238	62
Figura 88: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239 en medio ICC	63
Figura 89: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8239	63

	Página
Figura 90: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798 en medio ICC	63
Figura 91: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> NCTC 8798	63
Figura 92: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> FD-1 en medio ICC	64
Figura 93: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> FD-1	64
Figura 94: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano que inhibe el crecimiento de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624 en medio ICC	64
Figura 95: Efecto del 25, 50 y 75% de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de <i>C. perfringens</i> ATCC 3624	64

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Plantas Estudiadas	19
Tabla 2: Diagrama de Inmunización	23
Tabla 3: Peso Seco Obtenido de los Extractos Acuosaos de las Plantas Utilizadas	27
Tabla 4: Número de Células del Inóculo de 5 cepas de <i>C. perfringens</i> a Diferentes Tiempos de Incubación	28
Tabla 5: CMI de Extractos Acuosaos de Plantas que Inhiben el Crecimiento de cepas de <i>C. perfringens</i> en medio de Müeller-Hinton	29
Tabla 6: CMI de Extractos Acuosaos de Plantas que Inhiben el Crecimiento de cepas de <i>C. perfringens</i> en medio de Duncan y Strong	33
Tabla 7: CMI de Extractos Acuosaos de Plantas que Inhiben la Formación de Esporas de cepas de <i>C. perfringens</i> en medio de Duncan y Strong	34
Tabla 8: Concentraciones Usadas en la Determinación del Efecto sobre la Formación de Esporas y la Producción de Enterotoxina en <i>C. perfringens</i> tipo A	35
Tabla 9: Efecto de Extractos de Plantas sobre la Producción de Enterotoxina de <i>C. perfringens</i> tipo A	46
Tabla 10: CMI de Extractos Acuosaos de Plantas que Inhiben el Crecimiento de cepas de <i>C. perfringens</i> en medio Infusión Cerebro-Corazón	47
Tabla 11: Concentraciones Usadas en la Determinación del Efecto de extractos sobre el Crecimiento y la Producción de Fosfolipasa C en <i>C. perfringens</i> tipo A	48
Tabla 12: Concentración Mínima Inhibitoria por Penicilina G sobre el Crecimiento de <i>C. perfringens</i> tipo A	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{600}	Absorbancia a 600 nm
A.C.	Antes de Cristo
ANOVA	Análisis de Varianza
ATCC	Colección de Cultivos "Tipo" Americano (American Type Culture Collection)
°C	Grados Centígrados
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
$CaCO_3$	Carbonato de Calcio
cm	Centímetro (s)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO_2	Dioxido de Carbono (gas)
D.C.	Después de Cristo
D-S	Medio de Duncan y Strong
EDTA	Acido Etilen-diamino-tetra-acético
E.U.A.	Estados Unidos de America
Fig.	Figura
Figs.	Figuras
x g	Fuerza Gravitacional
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
ICC	Medio de Infusión Cerebro-Corazón
l	Litro (s)
M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramo (s)
M-H	Medio de Müller-Hinton
min	Minuto (s)

ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
μ	Micrómetro (s)
μ g	Microgramo (s)
μ l	Micro litro (s)
N ₂	Nitrogeno (gas)
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetro (s)
No.	Número (s)
NCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo (National Type Culture Colection)
pH	Logaritmo Reciproco de la Concentración de Ion Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-cloruro
p/v	Porciento Peso / Volúmen
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
sp.	Sin Especie
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por Mililitro
v/v	Porciento Volúmen / Volúmen
%	Porciento

RESUMEN

Clostridium perfringens ha sido históricamente asociado como causa de gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial); la cual está fuertemente relacionada con la producción de fosfolipasa C. Su papel como causante de una toxi-infección alimentaria fue determinado a principios de los años setentas, donde se involucró la producción de una enterotoxina durante la esporulación de la bacteria. En diversos estudios se ha demostrado que las plantas son una fuente importante de sustancias capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos y en algunos casos de la producción de sus toxinas. Recientemente se demostró que varios extractos de plantas de la región Norte de la República Mexicana inhibían el crecimiento de *C. perfringens*. Por lo que era importante determinar el efecto de estos extractos sobre la esporulación, la producción de enterotoxina y de fosfolipasa C de esta bacteria. En este trabajo se analizaron extractos acuosos de 10 especies de plantas del norte de la república que son usadas comúnmente en la medicina tradicional o como especias en los alimentos. Estos fueron adicionados a los medios Müeller-Hinton, Duncan y Strong e Infusión Cerebro-Corazón. En todos ellos se determinó la concentración mínima que inhibía el crecimiento, mientras que en el segundo se determinó además la concentración mínima que inhibía la esporulación y la producción de enterotoxina; y en el tercero se determinó la producción de fosfolipasa C. La medición del crecimiento se realizó espectrofotométricamente. La formación de esporas se determinó usando el

método de cuenta viable en placa. La producción de enterotoxina fue cuantificada por el método de contraimmunoelectroforesis y la de fosfolipasa C por el método de Van Heyningen. Las concentraciones mínimas de 10 extractos de plantas que inhibieron el crecimiento de cinco cepas de *C. perfringens* tipo A fueron: de 1.65 a 30 mg/ml en el caldo Müeller-Hinton (M-H), el medio de Duncan y Strong de 9.6 a 119 mg/ml y de igual forma para el medio de Infusión Cerebro-Corazón. La concentración mínima que inhibió la esporulación de estos fueron de 6.4 mg/ml a 96 mg/ml. El análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre el comportamiento de las cepas usadas en los tres medios al igual que los extractos usados en el medio de ICC. Sin embargo, si las hay entre los diferentes extractos en los medios de Müeller-Hinton y Duncan y Strong, al igual que entre los diferentes medios (M-H, D-S e ICC) con $\alpha=0.05\%$. Por otra parte se observó que la adición del 25, 50 y 75 % de la CM de los diferentes extractos indujo una reducción en la formación de esporas y crecimiento, así como una disminución en la producción de ambas toxinas bajo las condiciones anteriores.

INTRODUCCION

C. perfringens es una bacteria de forma bacilar, gram positiva, formadora de esporas, encapsulada y no móvil. Es capaz de producir más de 13 proteínas biológicamente activas. Algunas son toxinas con actividad enzimática, y una de ellas es una enterotoxina. Las cepas se han clasificado en 5 tipos (A-E) de acuerdo a la producción de 4 toxinas extracelulares: alfa, beta, epsilon e iota (Labbé, R.G. 1989).

C. perfringens ha sido históricamente asociado como causa de gangrena gaseosa; este patógeno se relacionó también como causante directo de una toxi-infección alimentaria desde principios de los años setentas (Labbé, R.G. 1989). Además de estas enfermedades, se le ha involucrado como agente causal de diarrea infecciosa asociada a la administración de antibióticos (Borriello, S.P. *et al* 1984; Larson, H.E. y S.P. Borrelio. 1988) y se le ha asociado con el síndrome de muerte súbita infantil (Murrel, T.G.C., *et al* 1987).

La principal toxina involucrada en la producción de gangrena gaseosa es la fosfolipasa C (α toxina) (Willis, A.T. 1960; McDonel, J.L. 1986; Colowick, S.P. y N.O. Kaplan 1988), mientras que en la intoxicación alimentaria, la diarrea infecciosa y el síndrome de muerte súbita infantil es la enterotoxina (Labbé, R.G. 1988).

Para combatir estas y otras enfermedades se han establecido tratamientos quimioterapéuticos, sin embargo, muchos de los microorganismos han adquirido con el paso del tiempo, resistencia contra los antibióticos usados

en la actualidad (Solórzano, S.F., *et al* 1987). Por otro lado, muchos de los antimicrobianos de uso común pueden presentar un espectro limitado, efectos colaterales serios y en algunos casos son difíciles de obtener ya sea por su precio o por su disponibilidad (Solórzano, S.F., *et al* 1987; Ikan, R. 1991). Es por esto que ha sido necesario buscar alternativas terapéuticas para combatir o controlar a los organismos patógenos.

Desde la existencia del hombre mismo, las plantas han sido el sostén de la especie humana y algunas de ellas han sido usadas como 'medicinas' para curar malestares (Alcocer, J.M. 1992). Es por esto y aunado a sus características saborizantes y aromáticas, que en la actualidad muchos de estos vegetales son también utilizados en el procesamiento de los alimentos, como saborizantes y como conservadores (Conner, D.E. 1993).

México presenta en su superficie casi todos los biomas existentes en el planeta, por lo que es uno de los países con la mayor diversidad vegetal a nivel mundial. En la actualidad se estima que en nuestro país existen aproximadamente 30,000 especies de plantas (Lugo, E.E. 1992). En diversos estudios se ha demostrado que las plantas son una importante fuente de sustancias capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos (Conner, D.E., 1993) y en algunos casos la producción de sus toxinas (Nychas, G.J. y R.G. Board. 1991; Tranter, H.S., *et al* 1993).

Recientemente se demostró que 24 extractos de un total de 33 plantas de la región norte de la República Mexicana inhibían el crecimiento de *C.*

perfringens (Sanchez-García, C.A. 1995). Por lo que en este trabajo se consideró importante determinar el efecto de 10 extractos de esas plantas sobre el crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de cepas de *C. perfringens* tipo A.

ANTECEDENTES

Clostridium perfringens.

Es un bacilo anaerobio, gram positivo, encapsulado, formador de esporas, inmóvil, que produce mas de trece toxinas diferentes. Se clasifica en cinco tipos: A, B, C, D y E de acuerdo con la producción de cuatro toxinas extracelulares α , β , ϵ y ι (alfa, beta, epsilon e iota) (Labbé, R.G., 1989). A esta se le considera la bacteria más ampliamente distribuida en el medio ambiente, ya que se le ha encontrado en suelo, en agua, en alimentos, en el intestino de casi todos los animales y en el aire (Labbé, R.G., 1989). La diversidad de ambientes y el número en que se puede encontrar este patógeno, se ven muy favorecidos por su capacidad de formar esporas. Estas últimas son extremadamente resistentes al calor y a otros factores (Labbé, R.G., 1991); lo cual le puede permitir sobrevivir a algunos procesos rutinarios de preservación de alimentos o a procesos defectuosos de esterilización de material biológico o quirúrgico (Moat, A.G. y J.W. Foster, 1988). Por otra parte el microorganismo puede tener tiempos de generación tan cortos como 7.1 min, lo que favorece un crecimiento rápido (Willardsen, R.R., *et al* 1978).

El microorganismo ha sido históricamente asociado con la gangrena gaseosa (Labbé, R.G. 1988). Esta enfermedad es la forma más severa de infección necrosante causada por este género y principalmente por *C. perfringens* tipos A y C.

La mionecrosis clostridial se produce primero por la invasión de la bacteria en heridas traumáticas o quirúrgicas que generalmente comienzan con una lesión tisular y que se extiende rápidamente al tejido conectivo y al músculo contiguo debido a la producción de toxinas. Una de estas últimas que destaca es la fosfolipasa C, la cual destruye los capilares y evita la oxigenación de la zona. El siguiente paso es el establecimiento de un crecimiento bacteriano masivo con aumento de la necrosis y finalmente bacteremia. (Smith, D.S. y B.L. Williams, 1984; Holland, K.T. *et al* 1987). Los signos y síntomas de esa enfermedad aparece de 6 a 72 h después de la lesión inicial, presentándose un color bronceado o amoratado en la piel, con exudado de líquido serosanguinolento. Se presentan burbujas de gas en el tejido subcutáneo, seguido de una insensibilidad de la zona afectada por las lesiones de los nervios periféricos. Si la enfermedad no se controla, se puede presentar una bacteremia y la muerte (Robbins, S. L. y R. S. Cotran, 1984; Swartz, M.N. 1985).

La fosfolipasa C (fosfatidil-colina colina fosfohidrolasa EC 3.1.4.3) es uno de los principales agentes que originan la gangrena gaseosa (Willis, A.T. 1960; McDonel, J.L. 1986; Colowick S.P. y N.O. Kaplan 1988); además es producida por todas las cepas de *C. perfringens* (Mollby, R., *et al* 1976). Esta es una proteína termoestable que hidroliza fosfatidilcolina a fosforilcolina y 1,2-diacil glicerol. Se ha demostrado que también afecta la esfingomielina y el lisofosfatidilcolina (Krug, E.L. y C. Kent 1984). Su peso molecular es de 30 kDa

cuando se usa cromatografía de exclusión molecular y presenta un punto isoeléctrico de 5.5 (Smyth, C.J. y J.P. Arbuthnott, 1974). La enzima presenta diversas actividades biológicas; se le considera dermonecrótica, hemolítica y letal (Sterne, M. y G.H. Warrac, 1964). Además, causa agregación y degradación de plaquetas, y un aumento en la permeabilidad vascular (Sugahara, T., 1977). Esta toxina afecta la membrana plasmática de la célula, de la mitocondria, del retículo endoplásmico y del núcleo, ya que desestabilizan los lípidos que las forman originando una muerte celular posterior (Smith, L.D. y B.L. Williams, 1984) La fosfolipasa C fue catalogada como la primera toxina mortal con actividad enzimática (Willis, A.T. 1960).

C. perfringens puede también causar una toxi-infección alimentaria debida a la ingestión de alimento contaminado. Se ha visto que los productos involucrados principalmente con esta enfermedad son de origen cárnico y embutidos (Lund, M.B. 1990). Para causar este padecimiento, los alimentos deben estar contaminados con una gran cantidad de células de ese microorganismo (entre 4×10^9 y 6×10^9 de ingesta total) (Borriello, S.P. *et al*, 1985). La sintomatología ocurre de 8 a 24 h después de la ingestión del alimento contaminado y se caracteriza por diarrea y dolor abdominal severo (Labbé, R.G. 1989). En el caso de la ingesta de alimentos contaminados con células vegetativas de *C. perfringens*, estas al llegar al intestino, esporulan, producen y liberan la enterotoxina originando los síntomas (Borriello, S.P. *et al* 1985; Lund, M.B. 1990).

A nivel celular, esta toxina se une un receptor de 50 kDa de las células del borde de cepillo del intestino; una vez adherida ocurre una inserción en la membrana formando vacuolas y poros, lo que origina cambios en la permeabilidad de la membrana modificando el flujo de iones, aminoácidos y nucleótidos (McClane, B.A., *et al* 1988; McDonnel, J.L., 1986). Además la proteína inhibe la síntesis de macromoléculas causando daño morfológico y muerte celular (Wneck, A. y B.A. McClane, 1989).

La enterotoxina se compone de una sola cadena protéica (Labbé, R.G., 1980), con 309 aminoácidos (Granum, P.E. y O. Harbitz, 1984). Esta tiene un peso molecular de 34,262 daltones y un punto isoeléctrico de 4.3 (Yotis, W.W. y C. Castimpolas, 1975).

Otro de los padecimientos relacionados con *C. perfringens* es la diarrea infecciosa cuya sintomatología es parecida a la toxi-infección alimentaria. La enfermedad también presenta dolor abdominal agudo y en muchos casos heces sanguinolentas, pero con una duración mayor que la anterior. Varios autores opinan que este cuadro resulta de una colonización persistente y de la sobrepoblación de *C. perfringens* en el intestino donde continuamente se está produciendo la enterotoxina (Larson, H.E. y S.P. Borrelío, 1988).

Por otro lado, en un estudio retrospectivo, se demostró la presencia de la enterotoxina de *C. perfringens* en muestras séricas y gastrointestinales de bebés que habían muerto por el síndrome de muerte súbita infantil. Los autores han sugerido que la enterotoxina podría jugar un papel directo o indirecto en la

causalidad de esa enfermedad, ya que varios reportes indican que cuando la toxina se administra intravenosamente en animales experimentales, se observan cambios en los tejidos que son similares a los mostrados en ese síndrome (Murrel, T.G.C., *et al* 1987).

En términos de incidencia de casos de intoxicación alimentaria reportados cada año, *C. perfringens* ha ocupado un segundo lugar en Canadá y en el Reino Unido y el tercero en Estados Unidos como causante de esa enfermedad (Robinson, J. y M. Messer 1969; Hatheway, C.L., *et al* 1980; Shandera, W.X., *et al* 1983). Este mismo problema se ha encontrado también en otros países como Brasil, Colombia, Japón y Noruega, entre otros (Borriello, S.P., *et al* 1985; Kumate, J. y A. Isibasi 1986; C.D.C. 1990). En estudios epidemiológicos realizados a lo largo de trece años (1972-1985), se demostró que *C. perfringens* causó 60,935 casos enfermedades alimentarias reportadas en los países industrializados de Europa (Guerrant, R.L. 1990).

Las plantas como antimicrobianos empíricos:

Se han encontrado pruebas que muestran que el empleo de plantas para fines terapéuticos data de alrededor de 8000 años, por lo que se puede suponer que este uso nace casi con la aparición del hombre sobre la tierra. El primer registro escrito al respecto se remonta a más de 3000 años A.C. y fue encontrado en China. Otros datos muestran que en el año 2500 A.C. los sumerios utilizaban una diversidad de plantas como terapéuticos. Algunos siglos

después, aproximadamente en el año 1500 A.C. se encontraron mas evidencias, donde los Egipcios usaban extractos de plantas contra muchas enfermedades; ellos agrupaban sus conocimientos de las propiedades de plantas en el Codex Ebers. En este manual existían aproximadamente 800 fórmulas para curar las enfermedades o heridas (Block, E. 1983; Magaña, R.H. y M.G. Jorda 1991; Lugo, E.E. 1992) ; también existen reportes similares de los Griegos y Romanos en el año 77 A.C. (Lugo, E.E. 1992).

En América los registros mas antiguos están contenidos en el Códice Badiano, el cual se remonta al año 1552 (fecha en que fue traducido al latín). En 1571 se escribió otro libro por Francisco Hernández para constatar la sabiduría indígena sobre plantas medicinales (Lugo, E.E. 1992).

Efectos de extractos de plantas en el crecimiento bacteriano:

Existen reportes de Louis Pasteur, del año 1858, donde describió la efectividad del ajo y la cebolla para eliminar algunas bacterias y hongos patógenos (Block, E. 1983; Delaha, E.C. y V.F. Garagusi 1985).

En las últimas décadas se ha reportado una gran cantidad de plantas cuyos extractos inhiben el crecimiento microbiano y entre los trabajos mas relevantes se encuentran los siguientes: A principios de este siglo, Match y Kunkel (1920) y Diche-Teague (1924) describieron los efectos antimicrobianos de aceites volátiles de fragancias crudas obtenidas de plantas y usadas en la preparación de jabón.

En los años 30, médicos australianos documentaron el uso de plantas usadas por los indígenas de la región como terapéuticos contra microorganismos patógenos. Ellos encontraron que presentaban efectos inhibitorios mas rápidos y fuertes que los medicamentos usados en esa época (Humphrey, E.M. 1930; Penfold, A.R. y F.R. Morrison 1937; Carson, C.F. y T.V. Riley 1993). En 1943, Osborn estudió los efectos de 2300 especies de plantas contra *S. aureus* y *E. coli* encontrando 63 géneros de plantas con actividad antimicrobiana. Mas tarde, en 1944, Huddleston *et al* describieron 23 géneros de plantas con efecto inhibitorio contra *E. coli*, *S. aureus* y *Brucella abortus*.

Por otra parte Sanders *et al*, en 1945, encontraron 15 plantas que inhibían el crecimiento de *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Hayes en 1946, descubrió la actividad de 46 especies de plantas contra al menos uno de los microorganismos siguientes: *E. coli*, *Erwinia carotovora* y *Phytomonas tumefaciens* (Mitscher, L.A. 1971).

Carlson *et al*, encontraron actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* en 115 especies de plantas de 550 estudiadas (Mitscher, L.A. 1971). De manera similar, Cardoso y De Santos detectaron una fuerte actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *Proteus X-19* en 4 de 104 plantas probadas (Mitscher, L.A. 1971; Carson, C.F. y T.V. Riley 1993).

Sporoston *et al*, observaron los efectos de extractos de 73 plantas sobre bacterias y hongos patógenos y encontraron que *Impatiens biflora* era la mas activa de las estudiadas.

Por otro lado, Atkinson estudió los efectos de 1200 especies de plantas con flores sobre el crecimiento de *S. aureus* y *Salmonella typhi*. El encontró 50 especies activas que inhibían el crecimiento de la primera bacteria y cuatro de la segunda (Mitscher, L.A. 1971).

En 1950, Bushnell *et al*, demostraron el efecto inhibitorio de *Micrococcus pyogenes*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de 42 plantas de un total de 101 probadas. Años después Malcolm y Sofowora en 1969 reportaron la actividad antimicrobiana de extractos de plantas encontradas en Nigeria contra algunas bacterias y hongos patógenos para el hombre.

En un estudio realizado por Mitscher *et al* en 1971, se encontró que de 156 especies de plantas estudiadas, la mayoría presentaban un efecto inhibitorio del crecimiento en al menos uno de los microorganismos probados (*S. aureus*, *E. coli*, *S. gallinarum*, *Klebsiella pneumuniae*, *Mycobacterium smegmatis* y *C. albicans*).

Al año siguiente se reportó el efecto de extractos de *Artemisia herba-alba* contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhosa*, *Shigella sonnei* y *Streptococcus hemoliticus*, además se determinó que el agente antibacteriano era el alcohol santolínico (Yashphe, J. *et al*, 1979).

En 1978 un estudio determinó el efecto de 521 fragancias crudas usadas en los jabones contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Se encontró que el 44% mostraba una inhibición contra al menos uno de los tres microorganismos. De esos extractos se seleccionaron 212 con

características lipofílicas y se probaron contra *Corynebacterium sp.* Se determinó que el 30% de esos fueron efectivos contra esta bacteria (Morris, A. *et al* 1978).

A principios de la década de los 80, McDuffie reportó que el extracto de ajo presentaba un efecto inhibitor del crecimiento en micobacterias y que era más eficaz que otros 55 tratamientos comerciales usados contra este género (Betto, P., *et al* 1988). Este estudio fue corroborado por Delaha y Garagusi en 1985.

En 1986, se demostró la presencia un nuevo grupo de sustancias con efectos antimicrobiales en presencia de luz solar en al menos 30 familias diferentes de plantas (Downum, K.R. 1986; Downum, K.R., *et al* 1989).

Al año siguiente (1987), Rios, Recio y Villar reportaron la actividad de 81 especies de plantas con efectos antimicrobianos, las cuales presentaban la posibilidad de ser usados como antisépticos o desinfectantes.

Un año más tarde Zaika (1988) encontró que el clavo (*Eugenia aromatica*) y la canela (*Cyannamomun zelyanicum*) presentaban efectos contra microorganismos gram positivos y gram negativos. También en ese año se demostraron en forma científica las propiedades bactericidas del té y el café contra patógenos gastrointestinales (Toda, M., *et al* 1988). A su vez Nicoletti, Serafini y Cassinovi reportaron que extractos de diversas plantas poseían efectos antineoplásicos así como también antibacteriales (Betto, P. *et al* 1988).

En 1990 se reportó que el grano de café (*Coffea arabica*) y la cocoa podían ser fuertes inhibidores del crecimiento de algunas bacterias que causan gastroenteritis y otras enfermedades peligrosas (Pearson, L.J. y E.H. Marth 1990). Chung *et al* en 1990, demostraron que extractos de plantas, usadas en la medicina tradicional china, presentaban un efecto antibacterial contra microorganismos asociados a alimentos y recomendaron su uso como conservadores.

En América Latina, Cáceres *et al* se han dado a la tarea de la búsqueda de extractos de plantas con efectos antimicrobianos. Entre 1990 y 1991 habían reportado efectos de aproximadamente 318 especies de plantas usadas en la medicina tradicional como terapéuticos empíricos.

Al año siguiente, se reportó el uso del vapor de isocianato de alilo, extraído de la mostaza (*Brassica juncea*), como preservativo en alimentos, ya que inhibía el crecimiento bacteriano (Isshiki, K. *et al* 1992). En otro trabajo se demostró que la zanahoria y sus extractos presentaban una fuerte inhibición contra microorganismos principalmente del género *Listeria*, y que esto se debía a compuestos polifenólicos y poliacetilénicos. Se recomendó el uso de este vegetal como preservativo en ciertos alimentos (Nguyen-the, C. y B.M. Lund 1992).

En 1994, se reportó que extractos de *Xanthium spinosum* L. presentaban actividad fungicida y bactericida. Se determinó que tal efecto fue debido a un compuesto llamado xantatina (Ginesta-Peris, E. *et al*, 1994). En este mismo año

se aislaron tres nuevos neo-clerodano-furan-diterpenos con efecto antimicrobial de las raíces de *Croton sonderianus* (Silveira, E.R. y J.R. McChensey 1994).

A principios de 1995, se reportó que los extractos acuosos y etanólicos de 33 plantas del norte de la República Mexicana presentaban efectos de inhibición del crecimiento sobre al menos una de once especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales (Sánchez-García, C.A. 1995).

Plantas como inhibidores de la formación de esporas y la producción de toxinas:

En 1974 se observó que las aguas residuales provenientes de una planta de fermentación de aceitunas, mostraban efecto antibacterial sobre organismos gram negativos y además que evitaban la formación de esporas de *Bacillus cereus* en los suelos regados con estas aguas (Flemming, H.P., *et al* 1973, Vazquez-Ronceno, A. *et al* 1974; Garrido-Fernández, A. y R.H. Vaugh 1978, Tranter, H.S. *et al* 1993)

En 1991 Nychas observó que extractos de ciertas plantas presentaban inhibición de la secreción proteica de *S. aureus*. En 1991, se determinó que el aceite de eucalipto presentaba efecto inhibitorio en la producción de toxinas producidas por *Aspergillus flavus* (Ansari, A.A. y A.K. Shivastava 1991).

Al año siguiente, Bilgrami *et al* encontraron que extractos de clavo, cebolla y ajo inhibían la producción de aflatoxinas de *A. flavus* (Bilgrmi, K.S. *et al* 1992).

Durante 1993, Tranter y colaboradores reportaron que los compuestos polifenólicos provenientes de los frutos del olivo provocaban una fuerte inhibición de la producción de la enterotoxina tipo B de *S. aureus*.

Como se ha visto, se ha demostrado el efecto antibacteriano de gran número extractos de plantas, así como en algunos de ellos la inhibición en la producción de toxinas. Sin embargo, hasta el momento se desconocían los efectos de las plantas de la región sobre la fisiología y los eventos metabólicos relacionados con las principales enfermedades causadas por *C. perfringens*. Por lo que en este trabajo pretendemos establecer el efecto de extractos de 10 de esas plantas sobre el crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *C. perfringenstipo* A.

HIPOTESIS

Los extractos acuosos de 10 plantas de la región presentan efectos inhibitorios del crecimiento, de la formación de esporas y de la producción de toxinas de *Clostridium perfringens* tipo A.

OBJETIVOS

- 1) Analizar el efecto de 10 extractos acuosos de plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens*.
- 2) Establecer la Concentración Mínima de los extractos que inhiben el crecimiento de *C. perfringens* en tres medios diferentes.
- 3) Determinar el efecto de esos extractos de plantas sobre la formación de esporas, la producción de enterotoxina y de fosfolipasa C de *C. perfringens*.

MATERIAL Y METODOS

Plantas Analizadas:

Se utilizaron 10 plantas para este estudio; el detalle de ellas se muestra en la tabla no. 1.

Tabla No. 1.- Plantas estudiadas

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	PARTE USADA
<i>Agave lechuguilla Torr.</i>	Lechuguilla	Raiz, Hojas
<i>Bacharis glutinosa Pers.</i>	Jarilla	Tallo, Hojas
<i>Cinnamomum zeylanicum Nees.</i>	Canela	Corteza
<i>Cyanomum cyanomum L.</i>	Comino	Frutos
<i>Eugenia aromatica Baill.</i>	Clavo	Frutos
<i>Flouresia cernua DC.</i>	Hojasen	Hojas
<i>Larrea tridentata DC Cov.</i>	Gobernadora	Tallo, Hojas, Flores
<i>Litsea glaucescens H.B.K.</i>	Laurel	Hojas
<i>Lantana involucrata L.</i>	Orégano	Hojas
<i>Yucca sp.</i>	Yuca	Raiz, Tallo

Cepas Usadas:

En este estudio se utilizaron cinco cepas de *C. perfringens* tipo A: dos no productoras de enterotoxina: FD- 1 y ATCC 3624; y tres productoras: NCTC 8238 (H-2), NCTC 8239 (H-3) y NCTC 8798 (H-9). Todas se mantuvieron en medio de carne cocida según Robertson a -20°C hasta su uso. Se hicieron resiembras cada 8 o 12 meses (García-Alvarado, J.S. 1990; García-Alvarado, J.S. 1992a).

Activación de las Cepas:

Para esto se utilizó el caldo con tioglicolato el cual se inoculó con 2 gotas del cultivo de reserva, e inmediatamente después se aplicó un choque térmico a 75 °C por 15 min. Posteriormente, se incubó a 37 °C por 16 a 18 h. (García-Alvarado, J.S. 1992b).

Determinación del Número de Inóculo:

De los cultivos activados se inocularon al 1% tubos con 5 ml de medio caldo con tioglicolato. Se incubaron a 37 °C y a las 14, 16 y 18 h se tomaron alícuotas y se determinó el número de células viables por el método de cuenta en placa. Este consiste en hacer diluciones decimales de cada tubo e inocularlos en cajas Petri a las que se agregó medio nutritivo con agar (Proteosa peptona 1.5%, extracto de levadura 1.0%, agar-agar 1.5%). Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 h en anaerobiosis con una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% de N₂ (García-Alvarado, J.S. 1990).

Obtención de los Extractos:

Las partes utilizadas de las plantas se lavaron y secaron a 30 °C. Se pesaron 20 g de la planta y se le agregó 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7. La mezcla se trituró en un mortero durante 5 o 6 min. El macerado se dejó en reposo por espacio de 16 - 18 h a 4 °C. La suspensión se filtró con papel Whatman No. 5 y posteriormente se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a

temperatura ambiente. El sobrenadante se esterilizó por filtración con membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ . El extracto estéril se colocó en viales que se mantuvieron a 4°C hasta su uso, pero por un período máximo de 20 días (Sánchez-García, C.A. 1995). Una alícuota del extracto se secó a 40 °C en viales tarados y pesados con el fin de determinar el peso seco como una medida de estandarización.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Crecimiento de *C. perfringens*:

Se utilizaron tubos de 13 x 100 mm con 5 ml de caldo Müller-Hinton (M-H); este medio es el recomendado por la ATCC para las pruebas de susceptibilidad con antimicrobianos. A estos tubos se agregaron diferentes concentraciones de los extractos (iniciando con 1 mg/ml). Después se inocularon con las cepas y se incubaron a 37 °C por 10 h. Durante este tiempo se realizaron determinaciones espectrofotométricas cada h a 600 nm (Sequoia-Turner Modelo 340). La CMI se definió como la concentración del extracto mas baja que inhibió el crecimiento de los microorganismos. Se utilizó un antibiótico comercial (penicilina G) como control positivo.

En el caso de los medios de Duncan y Strong (DS) o Infusión Cerebro-Corazón (ICC) para obtener las CMI se requirió la adición de cantidades mayores de extracto, lo cual coloreaba el cultivo, por lo que estas se determinaron mediante la observación de un frotis en fresco en el

microscopio de contraste de fases. La CMI el crecimiento se determinó como aquella concentración que presentaba menos de 5 células por campo en 10 campos observados (Estos valores se obtuvieron al observar frotis de los tubos del control inmediatamente después de haber sido inoculados donde se encontraron 5 células en 10 campos observados en promedio).

Efecto de extractos sobre la producción de esporas:

Se utilizaron tubos con medio DS los cuales fueron inoculados e incubados de la misma forma que el punto anterior. Para determinar el número de esporas formadas durante el periodo de incubación, se tomaron muestras de los cultivos a las 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h y se les realizó un choque térmico a 75 °C durante 15 min para eliminar a las células vegetativas. Inmediatamente después se procedió a realizar el método de cuenta viable en placa, tal como fué descrito anteriormente (García-Alvarado, J.S. 1992b). Además se utilizaron tubos con DS a los que se les agregó el 25, 50 y 75 % de la CMI de la formación de esporas con el fin de determinar el efecto sobre este proceso.

La CMI de la formación de esporas se definió como la concentración más baja del extracto que inhibió la formación de esporas termorresistentes.

Efecto de Extractos Sobre la Producción de Enterotoxina:

Se agregó el 25, 50 o 75 % de la CMI de la formación de esporas a 100 ml de medio D-S. Los cultivos se incubaron a 37 °C y después de las 8 h se

tomaron muestras de 10 ml de medio a las 24 h de cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 5,000 x g por 10 min a 5 °C. Los sobrenadantes se emvasaron en viales (1 ml) y se liofilizaron con el fin de concentrarlos. Posteriormente estos se resuspendieron en 100 µl de amortiguador de fosfatos (0.02 M pH 6.8); y se les determinó la concentración de enterotoxina presente.

Producción de suero anti-enterotoxina:

El suero fue producido en conejos de aproximadamente 5 kg según la metodología descrita por Bartholomew y Stringer (1983); y siguiendo el siguiente diagrama de inmunización:

Tabla No. 2.- Diagrama de inmunización

Concentración de enterotoxina (µg)	Volumen (ml)	Adyuvante completo de Freund*	Via de inoculación	Día de inoculación
3	0.25	+	Intramuscular	1
12	0.25	+	“	8
30	0.25	+	“	15
30	0.5	+	“	22
30	0.5	+	“	29
30	0.5	+	“	36
100	1	-	Intravenosa	45

* El volumen de adyuvante fue igual al de la dosis usada

El sangrado se realizó en el día 58 después de la primera dosis.

La actividad anti-enterotoxina del suero obtenido fue determinada mediante una contraimmunoelectroforesis, utilizando enterotoxina obtenida en nuestro laboratorio como antígeno y suero de referencia como control.

Detección de enterotoxina por Contraimmunoelectroforesis:

Esta técnica se desarrolló de acuerdo a la metodología descrita por Naik y Duncan en 1977 con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación:

Se utilizó una solución de agarosa tipo III (alta electroendosmosis) al 0.6 % (p/v) disuelta en amortiguador de barbital 0.06 M pH 8.6. De esta solución se añadieron 80 ml a una placa de vidrio de 20 x 20 cm previamente cubierta con una capa fina de agar al 1% (p/v) disuelto en el mismo amortiguador. Después de que la agarosa solidificó, se hicieron 5 hileras de pozos dobles con un diámetro de 4 mm, distanciados 5 mm entre cada pozo y 1.3 cm entre cada hilera. Los estándares de enterotoxina contenían 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 µg/ml. Se colocaron 10 µl de las muestras o los estándares en los pozos de las hileras más cercanas al cátodo. El suero anti-enterotoxina se diluyó 1:2 y se aplicó (10 µl) en los pozos de las hileras más próximas al ánodo.

Inmediatamente después se realizó una electroforesis horizontal, utilizando el amortiguador de barbital en los reservorios, y aplicando 130 Volts por un tiempo de 30 min. Terminado el tiempo, las placas se colocaron en una cámara húmeda y se mantuvieron a temperatura ambiente por 12-14 h.

Posteriormente la placa se tiñó con ácido tánico al 2% (p/v) recién preparado por 2 min y se determinó la presencia de bandas de precipitación. La última concentración del estándar que mostró banda se comparó con la última dilución de la muestra en la que se observó banda.

Efecto de extractos sobre la producción de Fosfolipasa C (α toxina):

Para determinar la actividad de la fosfolipasa de *C. perfringens* se inocularon (1 % de inóculo) tubos con ICC y a los cuales se agregó el 25, 50 y 75 % de la CMI del crecimiento. Los cultivos se incubaron a 37 °C y se tomaron muestras cada 2 h por un período de 14 h. Estas fueron centrifugadas a 5,000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y colocó en viales para después ser liofilizados. Los viales se guardaron a -20 °C hasta la determinación.

Los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en 200 μ l de agua destilada estéril y se procedió a cuantificar la actividad de la enzima mediante el método turbidimétrico de Van Heyningen siguiendo las modificaciones realizadas por Heredia 1996, de la siguiente forma:

De los sobrenadantes liofilizados y resuspendidos en agua destilada estéril se tomaron 100 μ l y se les adicionó 1 ml de una solución de trabajo base (Esta última fué preparada de la siguiente forma: se preparó una solución madre que contenía 0.9 g de lecitina de soya en 25 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.2 con 0.158 M de NaCl y 2.4 % de colato de sodio y de ésta se tomaron 16 ml y se diluyeron en 100 ml de amortiguador de Tris-HCl 20 mM pH

7.2 con 0.158 mM de NaCl, 10 mM de acetato de calcio y 0.2 mM de cloruro de zinc). Los tubos fueron mezclados e incubados por 1 h a 37 °C. Después de este tiempo la reacción fué detenida agregando 10 µl de EDTA 0.2 M y el aumento en la turbidez fue determinado espectrofotométricamente (Coleman Junior Modelo 340) (Jolivet-Reynau, C. 1988; Heredia, R.N.L. 1996). Una unidad de fosfolipasa C se definió arbitrariamente como un cambio de 0.2 unidades en la absorbancia a 510 nm.

RESULTADOS

Estandarización de los extractos :

La tabla 3 muestra los valores de peso seco de los extractos obtenidos después de triturar 20 g de planta y macerarlo por 16 a 18 h en 100 ml de amortiguador de fosfatos.

Tabla No. 3.- Peso seco obtenido de los extractos acuosos de las plantas utilizadas.

Nombre Científico	Nombre Común	Peso Seco (mg/ml)
<i>Agave lechuguilla</i> Torr.	Lechuguilla	160 ± 0.05*
<i>Bacharis glutinosa</i> Pers.	Jarilla	150 ± 0.05
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees.	Canela	150 ± 0.05
<i>Cyanomum cyanomum</i> L.	Comino	160 ± 0.05
<i>Eugenia aromatica</i> Baill.	Clavo	150 ± 0.05
<i>Flouresia cernua</i> DC.	Hojasen	150 ± 0.05
<i>Larrea tridentata</i> DC Cov.	Gobernadora	160 ± 0.05
<i>Litsea glaucescens</i> H.B.K.	Laurel	170 ± 0.05
<i>Lantana involucrata</i> L.	Orégano	170 ± 0.05
<i>Yucca</i> sp.	Yuca	170 ± 0.05

*.- Desviación típica de la media

Determinación del número de U. F. C. en el inóculo :

Se observó que en el inóculo la cantidad de unidades formadoras de colonia por ml encontradas a las 14, 16 y 18 h después de la activación fue similar (Tabla 4). Debido a esto, se utilizó para inocular los cultivos de los diferentes medios usados en las determinaciones del trabajo.

Tabla No. 4.- Número de células del inóculo de cinco cepas de *Clostridium perfringens* a diferentes tiempos de incubación.

Tiempo de Incubación (h)	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-I	ATCC 3624
	UFC/ml				
14 h	$5.1 \times 10^8 \pm 1.3$	$6.1 \times 10^8 \pm 1.4$	$5.0 \times 10^8 \pm 1.1$	$1.7 \times 10^8 \pm 1.2$	$2.1 \times 10^8 \pm 1.5$
16 h	$7.0 \times 10^8 \pm 1.1$	$7.3 \times 10^8 \pm 1.8$	$6.6 \times 10^8 \pm 1.5$	$7.7 \times 10^8 \pm 1.1$	$3.4 \times 10^8 \pm 1.1$
18 h	$2.5 \times 10^8 \pm 1.0$	$1.7 \times 10^8 \pm 1.2$	$2.3 \times 10^8 \pm 1.1$	$1.1 \times 10^8 \pm 1.4$	$1.0 \times 10^8 \pm 1.2$

* Desviación mínima de la media

Determinación de las CMI de *C. perfringens* en medio Müeller-Hinton.

En lo que se refiere a las CMI de los extractos en el medio de Müeller-Hinton observamos marcadas diferencias, ya que los resultados fueron de 1.65 mg/ml a 41.6 mg/ml (Tabla 5). El análisis estadístico realizado ANOVA y una prueba de diferencia de medias por el método de Tukey; mostró que no existían diferencias significativas entre las cepas utilizadas ($P > 0.05\%$). Sin embargo, si se encontraron diferencias significativas entre los extractos utilizados, siendo la *Y. sp.* la mas efectiva para inhibir el crecimiento y el hojase el menos efectivo (Figs. 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b).

Tabla No. 5.- CMI de extractos acuosos de plantas que inhiben el crecimiento de cepas de *C. perfringens* en el medio de Müeller-Hinton.

Planta (Nombre Científico)	Cepas Enterotoxigénicas			Cepas no Enterotoxigénicas	
	CMI (mg/ml)				
	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-I	ATCC 3624
<i>A. techuquilla</i> Torr.	3.2 ± 1.3*	4.8 ± 1.4	1.6 ± 0.9	18.4 ± 1.6	8.4 ± 1.6
<i>B. glutinosa</i> Pers.	10.5 ± 1.5	19.5 ± 1.5	39.0 ± 1.4	26.8 ± 1.5	31.6 ± 1.5
<i>C. zeylanicum</i> Nees.	1.4 ± 0.9	1.4 ± 1.0	2.8 ± 1.0	10.1 ± 1.4	10.1 ± 1.4
<i>C. cynanomun</i> L.	8.0 ± 1.5	11.2 ± 1.6	41.6 ± 1.7	18.4 ± 1.6	33.6 ± 1.6
<i>E. aromatica</i> Baill.	3.0 ± 1.1	1.50 ± 0.7	4.5 ± 1.09	6.04 ± 1.5	16.6 ± 1.5
<i>F. cernua</i> DC.	30 ± 1.5	25.5 ± 1.6	25.5 ± 1.5	18.4 ± 1.6	26.1 ± 1.5
<i>L. tridentata</i> DC Cov.	4.8 ± 1.2	1.62 ± 0.6	8.0 ± 1.5	6.4 ± 1.6	25.6 ± 1.6
<i>L. glausescens</i> H.B.K.	3.4 ± 1.0	6.8 ± 1.1	5.1 ± 1.6	8.6 ± 1.7	18.9 ± 1.8
<i>L. involucrata</i> L.	13.6 ± 1.7	15.3 ± 1.7	11.9 ± 1.7	5.1 ± 1.7	29.4 ± 1.7
<i>Y. sp.</i>	1.65 ± 0.9	1.70 ± 1.0	1.67 ± 1.0	1.65 ± 1.0	1.65 ± 1.0

*.- Desviación Típica de la Media

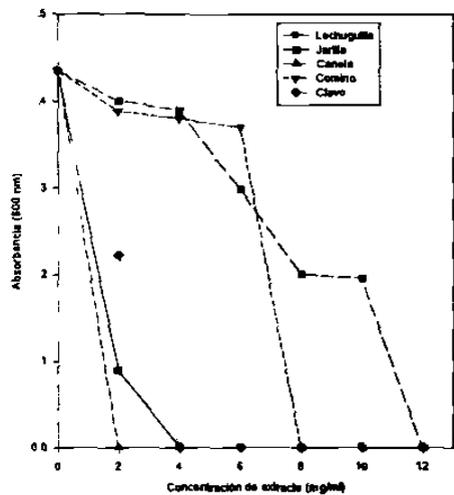


Fig. 1a.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio Müller-Hinton

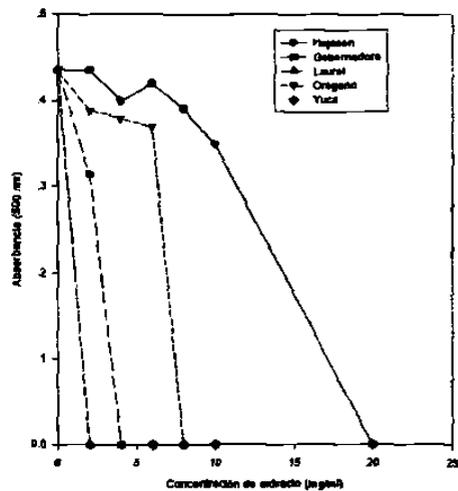


Fig. 1b.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio Müller-Hinton

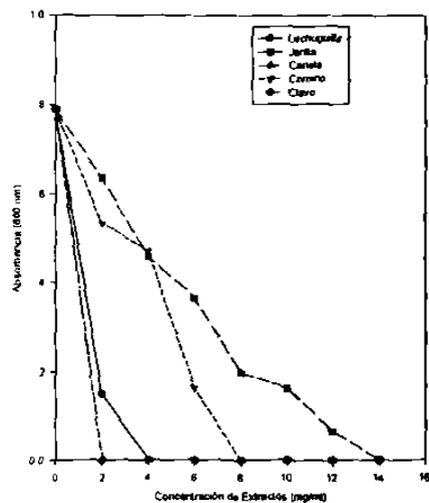


Fig. 2a.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio Müller-Hinton

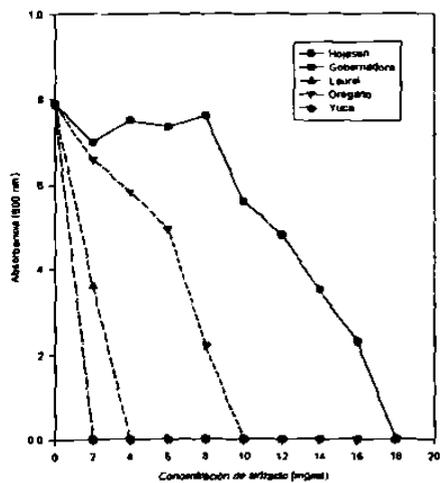


Fig. 2b.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio Müller-Hinton

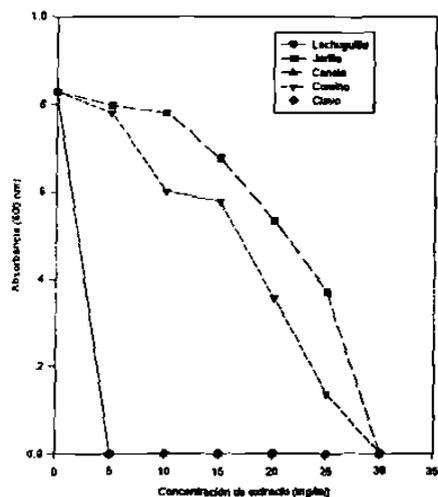


Fig. 3a.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio Müller-Hinton

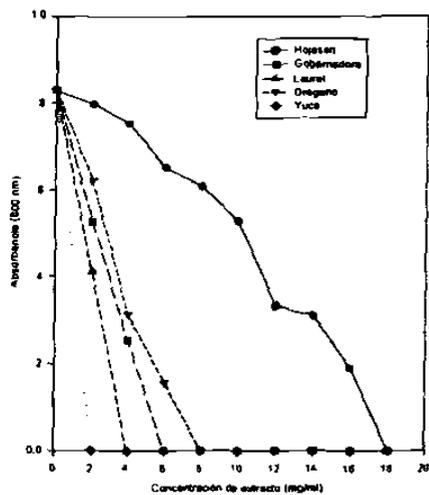


Fig. 3b.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio Müller-Hinton

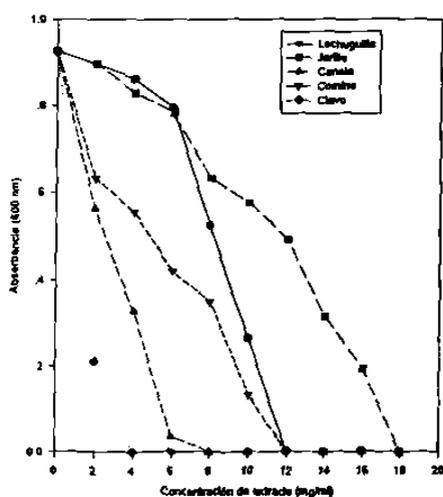


Fig. 4a.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio Müller-Hinton

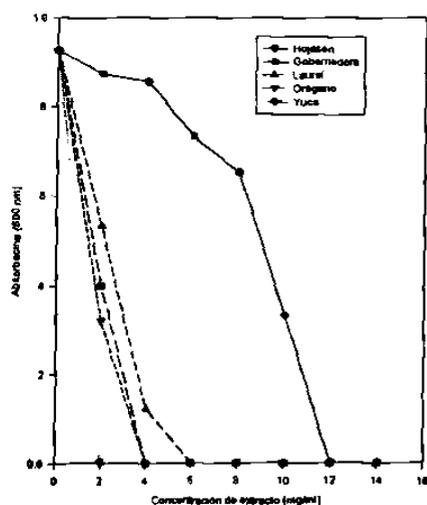


Fig. 4b.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio Müller-Hinton

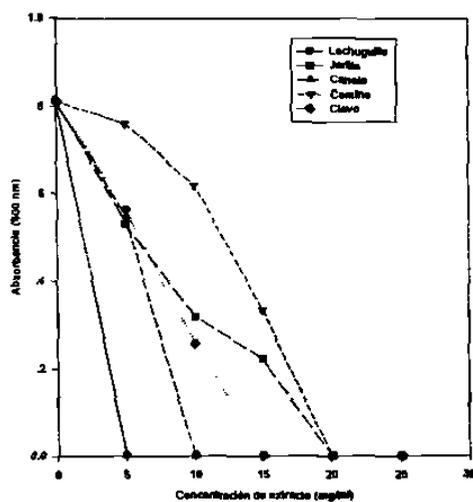


Fig. 5a.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. parvifrons* ATCC 3624 en medio Müller-Hinton

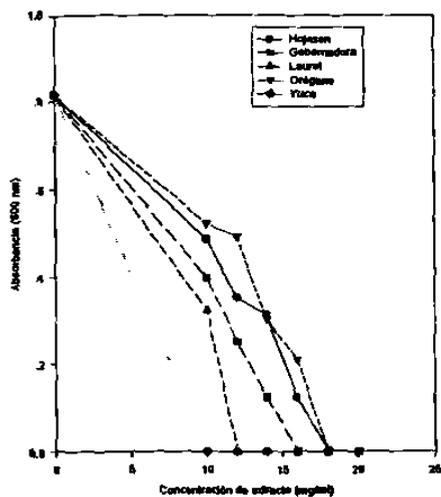


Fig. 5b.- Efecto de diferentes concentraciones de extractos de 5 plantas sobre el crecimiento de *C. parvifrons* ATCC 3624 en medio Müller-Hinton

Efecto de extractos de plantas sobre la formación de esporas

Debido a que la determinación de la formación de esporas y producción de enterotoxina se realizó en medio Duncan y Strong (DS); primero fué necesario determinar la CMI de los extractos en este medio. Cuando realizamos los ensayos para determinar la CMI en el medio D-S encontramos que estas estaban en un rango de 9.6 mg/ml a 119.0 mg/ml (Tabla 6), pero al igual que en el medio anterior no se presentaron diferencias significativas entre las cepas solas o al ser agrupadas en enterotoxigénicas y no enterotoxigénicas ($P > 0.05$). Sin embargo se encontraron diferencias entre los extractos probados por lo que se determinó que el extracto mas eficaz fue el de lechuguilla y el menos efectivo fué el de orégano.

Tabla No. 6.- CMI de extractos acuosos de plantas que inhiben el crecimiento de diferentes cepas de *C. perfringens* en el medio de Duncan y Strong.

Planta (Nombre Científico)	Cepas Enterotoxigénicas			Cepas no Enterotoxigénicas	
	CMI (mg/ml)				
	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-I	ATCC 3624
<i>A. lechuguilla</i> Torr.	20.8 ± 1.5*	16.0 ± 1.4	14.4 ± 1.6	9.6 ± 1.5	16.0 ± 1.5
<i>B. glutinosa</i> Pers.	60.0 ± 1.4	66.0 ± 1.5	63.0 ± 1.4	72.0 ± 1.5	60.0 ± 1.5
<i>C. zeylanicum</i> Nees.	47.6 ± 1.3	58.8 ± 1.4	49.0 ± 1.4	54.6 ± 1.5	42.0 ± 1.4
<i>C. cyanomun</i> L.	48.0 ± 1.5	57.6 ± 1.6	94.4 ± 1.6	68.8 ± 1.6	64.0 ± 1.6
<i>E. aromatica</i> Baill.	31.5 ± 1.5	31.5 ± 1.5	54.0 ± 1.4	39.0 ± 1.4	37.5 ± 1.5
<i>F. cernua</i> DC.	94.5 ± 1.6	76.5 ± 1.5	73.5 ± 1.5	61.5 ± 1.5	45.0 ± 1.5
<i>L. tridentata</i> DC Cov.	60.8 ± 1.6	57.6 ± 1.6	96.0 ± 1.6	80.0 ± 1.6	80.0 ± 1.6
<i>L. glausescens</i> H.B.K.	86.7 ± 1.7	93.5 ± 1.7	85.0 ± 1.7	103.7 ± 1.7	110.5 ± 1.7
<i>L. involucrata</i> L.	86.7 ± 1.7	86.7 ± 1.7	102.0 ± 1.7	110.5 ± 1.7	119.0 ± 1.7
<i>Y. sp.</i>	40.0 ± 1.6	38.4 ± 1.6	96.0 ± 1.6	115.0 ± 1.6	108.8 ± 1.7

*.- Desviación Típica de la Media

En relación con la formación de esporas encontramos que las CMI de los extractos que inhibieron la formación de esporas en el medio D-S variaron de 4.8 mg/ml a 96.0 mg/ml (Tabla 7). Al igual que en los puntos anteriores el análisis estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre las cepas utilizadas; pero si se encontraron diferencias significativas entre los extractos. Siendo el mejor inhibidor el de lechuguilla y el menos efectivo el de jarilla.

Tabla No. 7.- CMI de extractos acuosos de plantas que inhiben la formación de esporas de cepas de *C. perfringens* en el medio de Duncan y Strong.

Planta (Nombre Científico)	Cepas Enterotoxigénicas			Cepas no Enterotoxigénicas	
	CMI (mg/ml)				
	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-1	ATCC 3624
<i>A. lechuguilla</i> Torr.	14.4 ± 1.5*	12.8 ± 1.6	9.6 ± 1.6	6.4 ± 1.5	4.8 ± 1.6
<i>B. glutinosa</i> Pers.	52.5 ± 1.4	61.5 ± 1.5	63.0 ± 1.5	60.0 ± 1.5	43.5 ± 1.5
<i>C. zeylanicum</i> Nees.	47.6 ± 1.4	56.0 ± 1.4	47.6 ± 1.4	49.0 ± 1.4	40.6 ± 1.4
<i>C. cyanomun</i> L.	48.0 ± 1.6	56.0 ± 1.6	65.5 ± 1.6	64.0 ± 1.6	62.4 ± 1.6
<i>E. aromatica</i> Baill.	31.5 ± 1.5	31.5 ± 1.5	46.5 ± 1.5	37.5 ± 1.6	31.5 ± 1.6
<i>F. cernua</i> DC.	31.5 ± 1.5	31.5 ± 1.5	24.0 ± 1.5	46.5 ± 1.6	36.0 ± 1.6
<i>L. tridentata</i> DC Cov.	36.8 ± 1.6	56.0 ± 1.6	65.6 ± 1.6	80.0 ± 1.6	65.6 ± 1.5
<i>L. glaucescens</i> H.B.K.	44.2 ± 1.7	23.8 ± 1.6	52.7 ± 1.7	88.4 ± 1.7	54.4 ± 1.7
<i>L. involucrata</i> L.	42.5 ± 1.6	34.0 ± 1.6	69.7 ± 1.7	85.0 ± 1.7	66.3 ± 1.6
<i>Y. sp.</i>	22.4 ± 1.6	20.8 ± 1.6	80.0 ± 1.9	96.0 ± 1.6	76.5 ± 1.6

*.- Desviación Típica de la Media

De las CMI de la formación de esporas encontradas se determinó la media (Tabla 8) y se calculó el 25, 50 y 75% de esa concentración. Estas cantidades se usaron para determinar su efecto sobre la formación de esporas y la producción de enterotoxina

Tabla No. 8.- Concentraciones usadas en la determinación del efecto de extractos de plantas sobre la formación de esporas y la producción de enterotoxina en *C. perfringens* tipo A.

Planta (NOMBRE CIENTIFICO)	MEDIA DE LA CMI (mg/ml)	25% DE LA CMI (mg/ml)	50% DE LA CMI (mg/ml)	75% DE LA CMI (mg/ml)
<i>A. lechuguilla</i> Torr.	9.6 ± 0.2*	2.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2	7.2 ± 0.2
<i>C. zeylanicum</i> Nees	49.1 ± 0.5	12.3 ± 0.5	24.5 ± 0.5	36.8 ± 0.5
<i>E. aromatica</i> Baill	36.1 ± 0.8	9.1 ± 0.8	18.1 ± 0.8	27.1 ± 0.8
<i>F. cernua</i> DC	34.5 ± 0.3	8.7 ± 0.3	17.3 ± 0.3	25.9 ± 0.3
<i>L. glaucescens</i> H.B.K.	52.7 ± 0.9	13.2 ± 0.9	26.4 ± 0.9	39.5 ± 0.9
<i>L. involucreta</i> L.	59.5 ± 0.7	14.8 ± 0.7	29.6 ± 0.7	44.4 ± 0.7

*Nota:

Este valor representa la media de las CMI de las cinco cepas usadas con su desviación estandar respectivamente.

El extracto que presentó las CMI mas bajas para inhibir la formación de esporas fue el de lechuguilla; todas las cepas mostraron una marcada inhibición sobre la formación de esporas (Figs. 6, 7, 8, 9, 10).

En los extractos de canela, las cepas no presentaron una disminución del crecimiento tan marcada como en el caso anterior. Se observaron disminuciones de 1 o 2 unidades logarítmicas en las cepas NCTC 8238 y NCTC 8798; la cepa NCTC 8239 solo fue inhibida ligeramente, además, estas cepas presentaron un ligero retraso en la formación de esporas cuando se agregó al medio el 50 y 75 % de la CMI (Figs. 11, 12, 13). Al analizar las cepas no

enterotoxigénicas no observamos una inhibición marcada en la formación de esporas ya que presentaron niveles similares a los del control; sin embargo, se observó un retraso de hasta 4 h en la aparición de estas (Figs. 14, 15).

El extracto de clavo mostró una inhibición importante en la formación de esporas en las cepas enterotoxigénicas (Figs. 16, 17, 18) ya que pudimos apreciar una disminución de 3 a 5 unidades logarítmicas en comparación con el control. Estas cepas presentaron un retraso en la formación de esporas de 2 a 4 h dependiendo de la concentración de extracto probado. La cepa FD-1 fue inhibida moderadamente por este extracto (2 unidades logarítmicas al 75 % de la CM) (Fig. 19), mientras que para la cepa ATCC 3624 se observó una inhibición en la concentración mayor (Fig. 20). Ambas cepas tuvieron un retraso en la formación de esporas que varió de 2 a 6 h, dependiendo de la concentración del extracto.

El extracto de hojaseñ mostró una inhibición muy leve de la formación de esporas en las cepas enterotoxigénicas (1 unidad logarítmica) en la concentración mas alta usada. De la misma forma, se observó un retraso en la formación de esporas de 2 a 4 h, en las concentraciones probadas (Figs. 22, 23, 24). Cuando analizamos las cepas no enterotoxigénicas se observó un aumento en la formación de esporas en casi una unidad logarítmica al utilizar la concentración mas baja, sin embargo, también se observó un retraso de 2 a 6 h en este proceso dependiendo de la concentración usada (Figs. 24, 25).

En caso del extracto de laurel, este mostró efectos muy variables dependiendo de la cepa utilizada. La cepa NCTC 8238, fue fuertemente inhibida por este extracto, (de 4 a 6 unidades logarítmicas) y además produjo un retraso en la formación de esporas de hasta 4 h dependiendo de la concentración (Fig. 26); la cepa NCTC 8239, presentó una inhibición moderada (2 unidades logarítmicas) con la concentración del 25 %, el resto de las concentraciones inhibieron totalmente la formación de esporas ya que estas se encontraban arriba del promedio de la CMI (Fig. 27); por otro lado en las cepas NCTC 8798 y FD-1, no se inhibió formación de esporas (Figs. 28 y 29). Cuando analizamos la cepa ATCC 3624 se observó un incremento en la formación de esporas de hasta una unidad logarítmica a las 10 h de incubación. Sin embargo, también se observó un retraso de 2 h en la formación de esporas en todas las concentraciones usadas (Fig. 30).

Con el extracto de orégano se observó una disminución en la cantidad de esporas (2 a 5 unidades logarítmicas). Sin embargo para la cepas NCTC 8238 y NCTC 8239 no se produjo un retraso en la aparición de las esporas (Figs. 31, 32, 33, 34, 35).

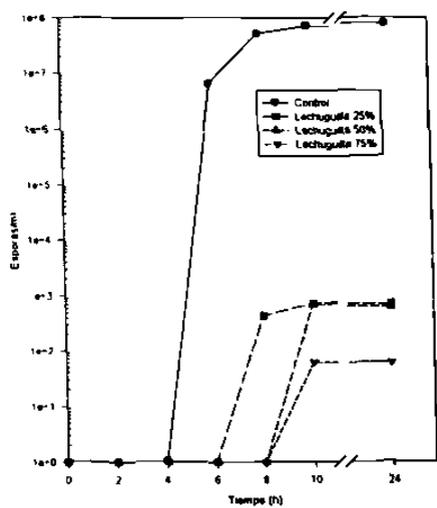


Fig. 6.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de *C. parvringens* NCTC 8238

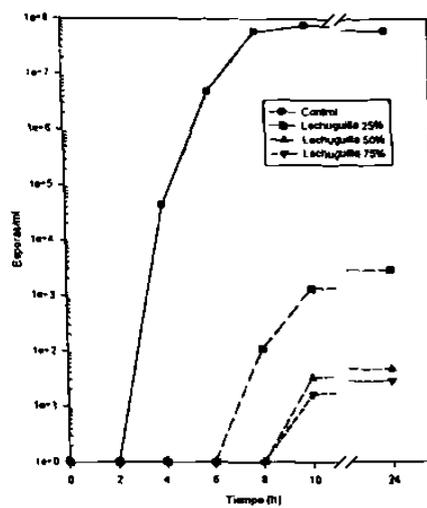


Fig. 7.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de *C. parvringens* NCTC 8239

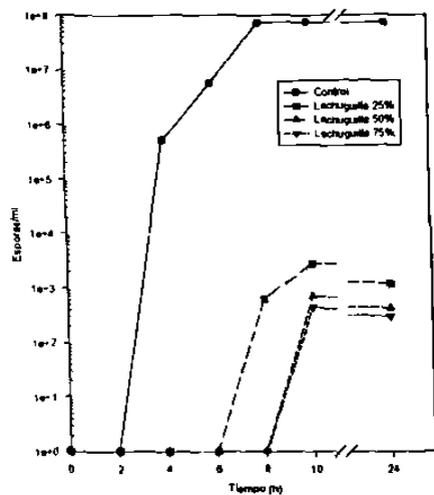


Fig. 8.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de *C. parvringens* NCTC 8798

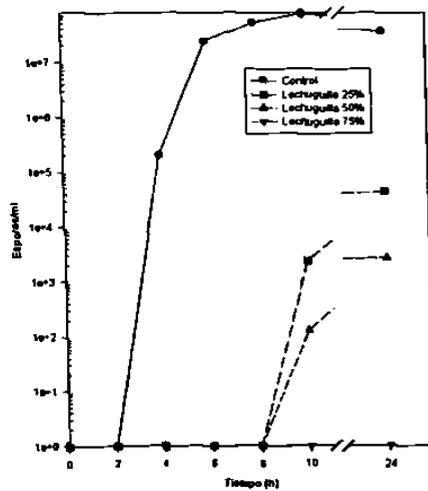


Fig. 9.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de *C. parvringens* FD-1

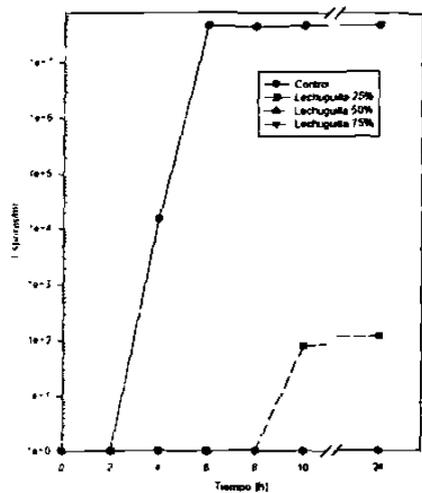


Fig. 10.- Efecto del 35, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la formación de esporas de *C. perfringens* ATCC 3624

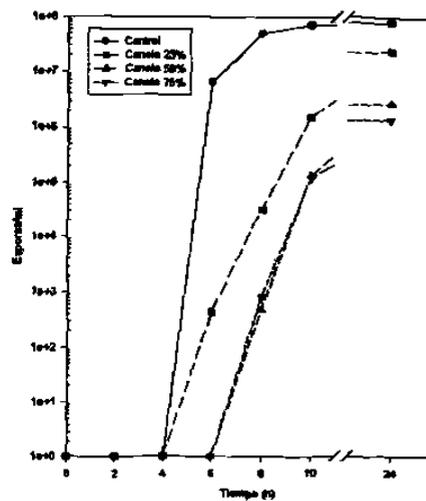


Fig. 11.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8238

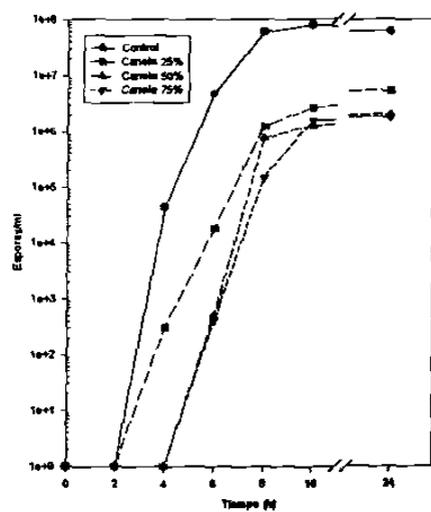


Fig. 12.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8238

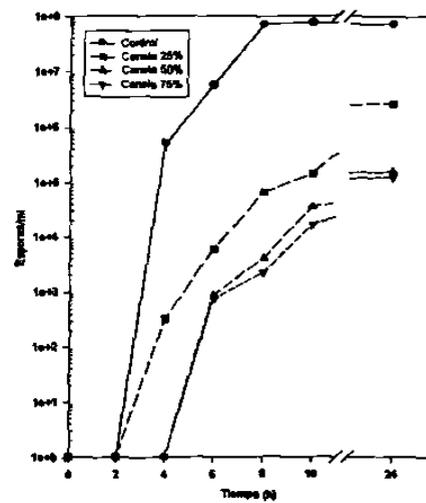


Fig. 13.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8798

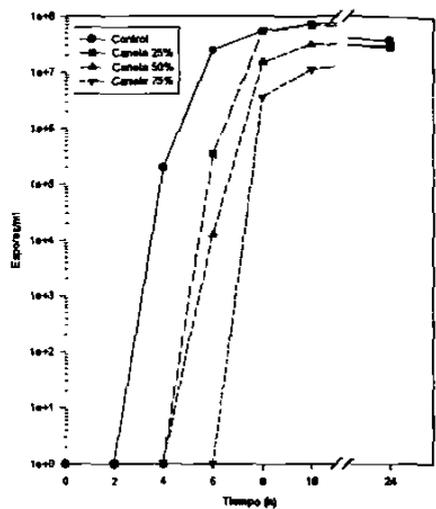


Fig. 14.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de *C. parfringens* FD-1

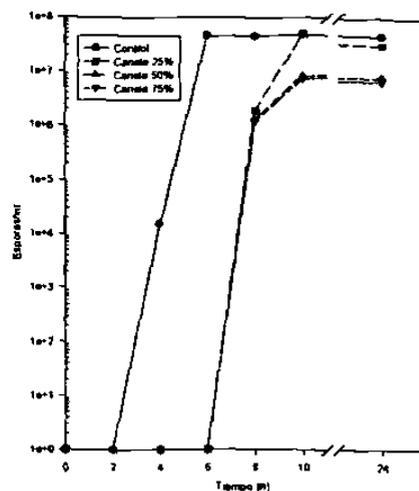


Fig. 15.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la formación de esporas de *C. parfringens* ATCC 3624

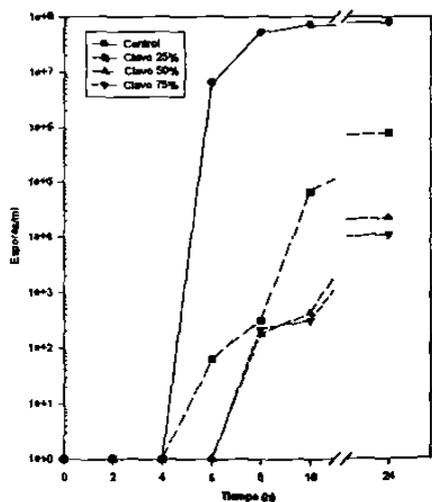


Fig. 16.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de *C. parfringens* NCTC 8238

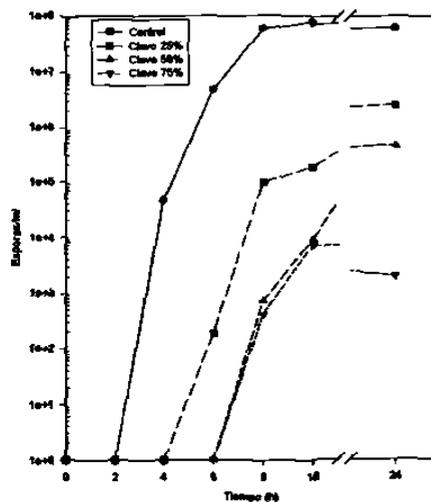


Fig. 17.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de *C. parfringens* NCTC 8238

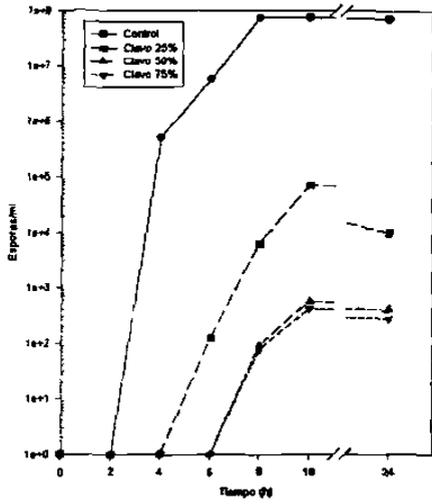


Fig. 19.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 3798

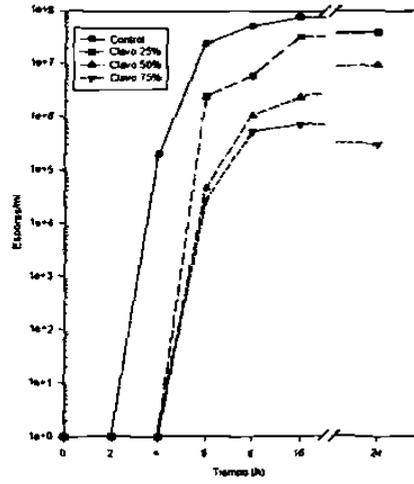


Fig. 18.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de *C. perfringens* FD-1

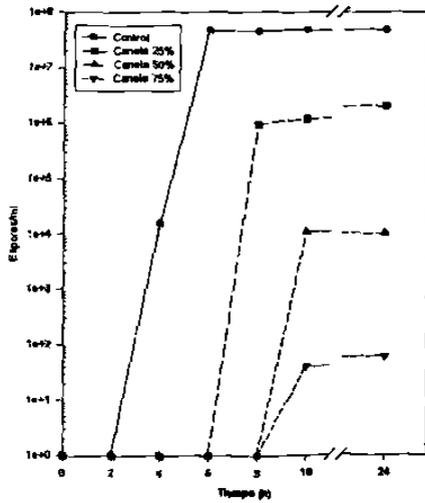


Fig. 20.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la formación de esporas de *C. perfringens* ATCC 3624

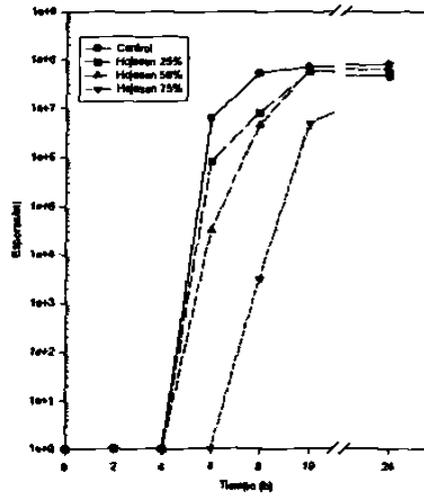


Fig. 21.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de hojases sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 6238

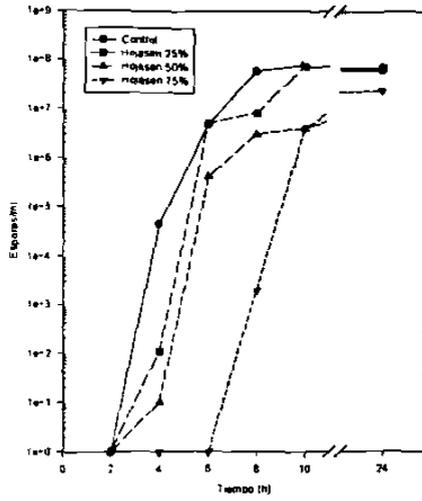


Fig. 22.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de hojaseen sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8239

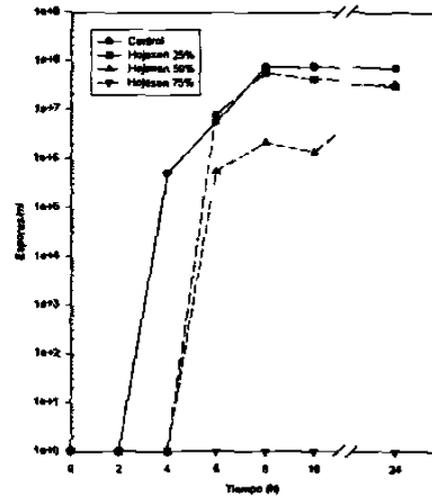


Fig. 23.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de hojaseen sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8798

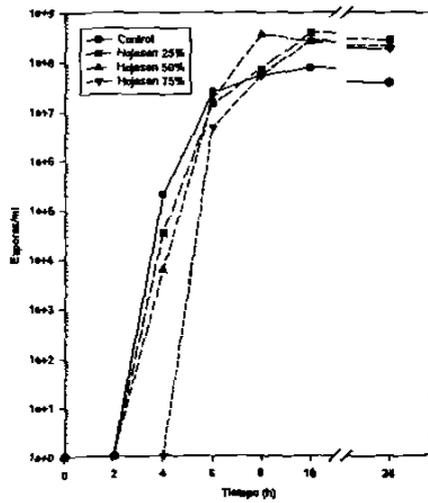


Fig. 24.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de hojaseen sobre la formación de esporas de *C. perfringens* tipo A cepa FD-1

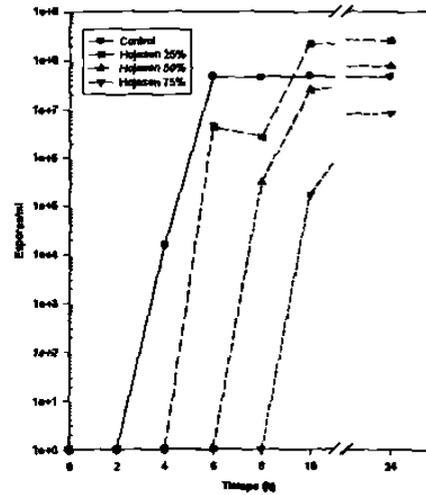


Fig. 25.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de hojaseen sobre la formación de esporas de *C. perfringens* ATCC 3624

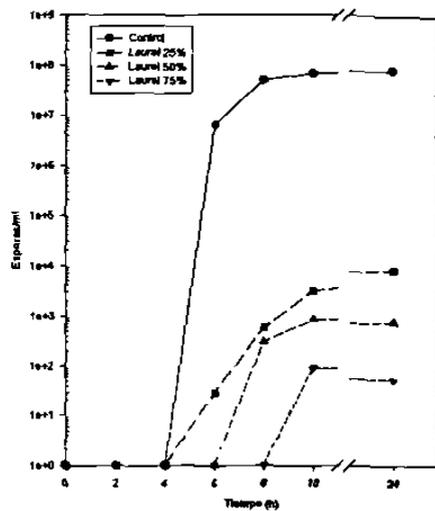


Fig. 26.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8239

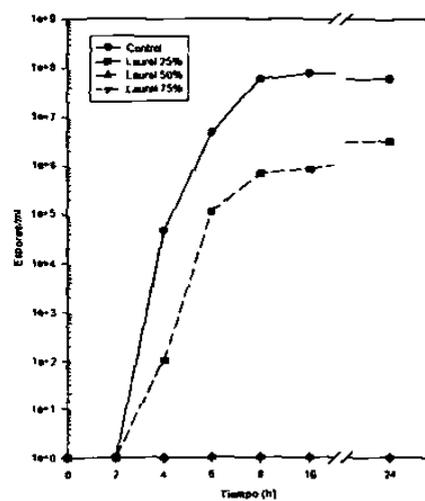


Fig. 27.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8238

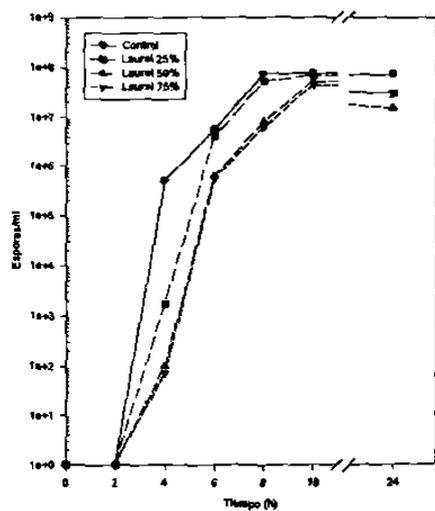


Fig. 28.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8798

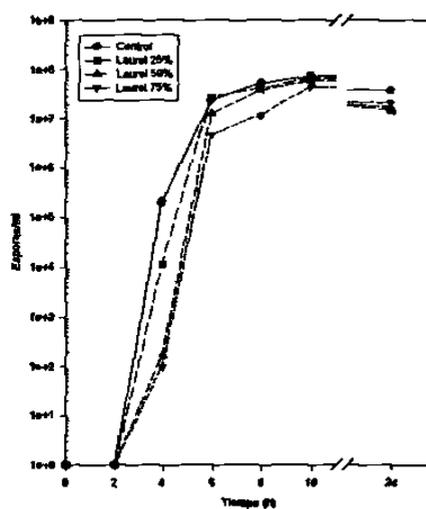


Fig. 29.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de *C. perfringens* FD-1

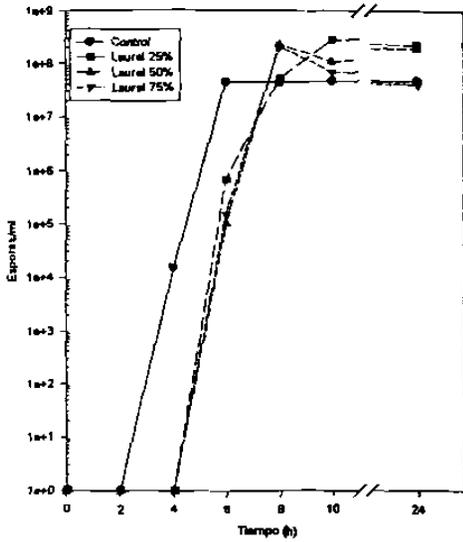


Fig. 30.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de laurel sobre la formación de esporas de *C. perfringens* ATCC 3624

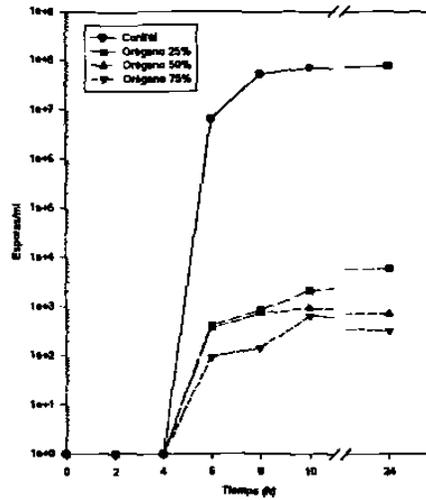


Fig. 31.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8238

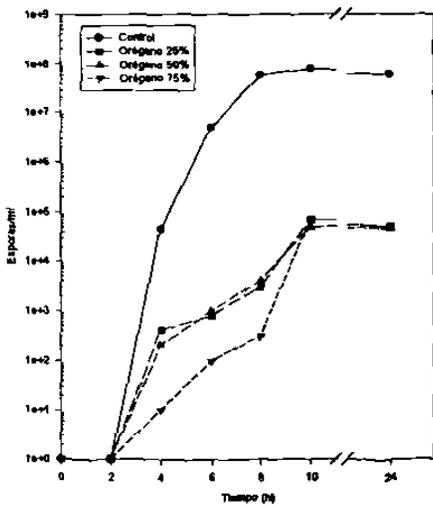


Fig. 32.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8239

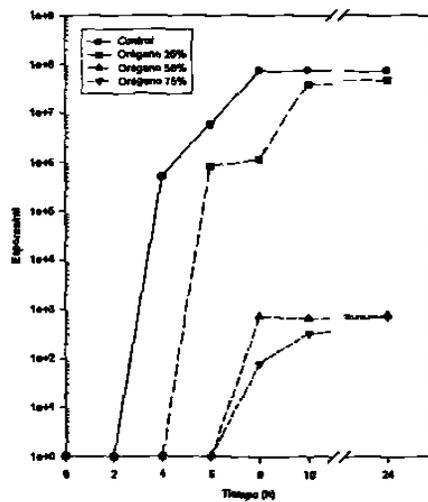


Fig. 33.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de *C. perfringens* NCTC 8788

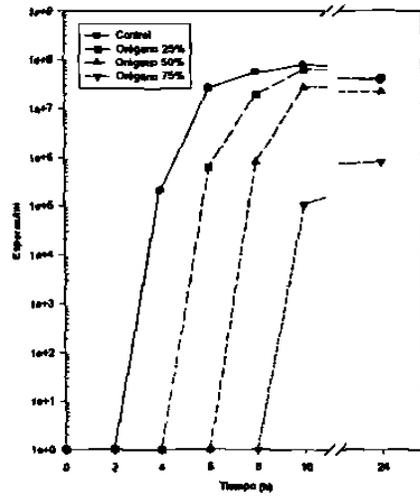


Fig. 34.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de *C. perfringens* PD-1

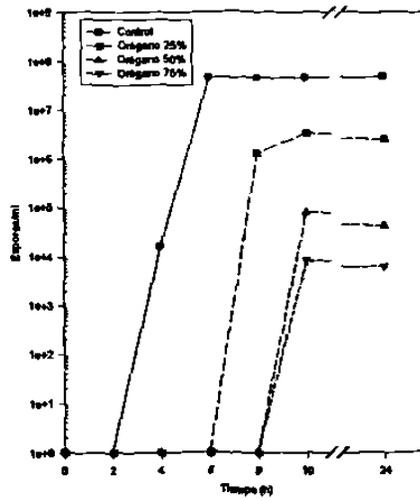


Fig. 35.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la formación de esporas de *C. perfringens* ATCC 3624

Efecto de extractos de plantas en la producción de enterotoxina:

Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 9. En general encontramos que el extracto de lechuguilla inhibe la producción de toxina en las cepas probadas; en algunas (NCTC 8238 y NCTC 8239) la canela, el clavo y el orégano también mostraron este efecto. De forma contraria el laurel y el hojaseñ estimulan la producción de esta enterotoxina.

Tabla No. 9.- Efecto de extractos de plantas sobre la producción de enterotoxina de *C. perfringens*, la determinación se realizó a los sobrenadantes después de 24 h de incubación.

Planta	Concentración % de la CMI	Producción de enterotoxina ($\mu\text{g/ml}$)		
		NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798
Control	0 %	40	40	40
<i>A. lecheguilla</i> Torr.	25%	0	0	0
	50%	0	0	0
	75%	0	0	0
<i>C. zeylanicum</i> Nees.	25%	0	5	20
	50%	0	5	20
	75%	0	5	10
<i>E. aromatica</i> Baill.	25%	0	0	2.5
	50%	0	0	2.5
	75%	0	0	2.5
<i>F. cernua</i> DC.	25%	160	160	80
	50%	160	160	80
	75%	80	80	0
<i>L. glausescens</i> H.B.K.	25%	40	80	20
	50%	40	0	20
	75%	20	0	10
<i>L. involucrata</i> L.	25%	0	0	40
	50%	0	0	20
	75%	0	0	10

Efecto de extractos de plantas en la producción de fosfolipasa:

Debido a que la determinación de la producción de fosfolipasa se realizó en el medio de Infusión Cerebro-Corazón (ICC); primero fue necesario determinar la CMI de los extractos en este medio. Los resultados se presentan resumidos en la tabla 10. Las CMI se encontraron desde 9.6 mg/ml y 119.0 mg/ml. El análisis estadístico (Análisis de Varianza y Prueba de Tukey) mostró que no existían diferencias significativas entre el efecto de los extractos sobre las cepas solas o entre las productoras y no productoras de enterotoxina, de igual forma no se encontraron diferencias significativas entre los extractos probados con una significancia del 0.05%.

Tabla No. 10.- Concentraciones Mínimas (CM's) de extractos acuosos de plantas que inhiben el crecimiento en el medio de Infusión Cerebro-Corazón.

Planta (Nombre Científico)	Cepas Enterotoxigénicas			Cepas no Enterotoxigénicas	
	CMI en mg/ml				
	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-I	ATCC 3624
<i>A. lechuguilla</i> Torr.	20.8 ± 1.5*	16.0 ± 1.4	14.4 ± 1.4	9.6 ± 1.5	16 ± 1.5
<i>B. glutinosa</i> Pers.	60.0 ± 1.4	66.0 ± 1.5	63.0 ± 1.4	72.0 ± 1.5	60.0 ± 1.5
<i>C. zeylanicum</i> Nees.	47.6 ± 1.3	58.8 ± 1.4	49.0 ± 1.4	54.6 ± 1.5	42.0 ± 1.4
<i>C. cynanomun</i> L.	48.0 ± 1.5	57.6 ± 1.6	94.4 ± 1.6	68.8 ± 1.6	64.0 ± 1.6
<i>E. aromatica</i> Baill.	31.5 ± 1.5	31.5 ± 1.5	54.0 ± 1.4	39.0 ± 1.5	37.5 ± 1.5
<i>F. cernua</i> DC.	94.5 ± 1.6	76.5 ± 1.5	73.5 ± 1.5	61.5 ± 1.5	45.0 ± 1.5
<i>L. tridentata</i> DC Cov.	60.8 ± 1.6	57.6 ± 1.6	96.0 ± 1.6	80.0 ± 1.6	80.0 ± 1.6
<i>L. glausescens</i> H.B.K.	86.7 ± 1.7	93.5 ± 1.7	85.0 ± 1.7	103.7 ± 1.7	110.5 ± 1.7
<i>L. involucrata</i> L.	86.7 ± 1.7	86.7 ± 1.7	102.0 ± 1.7	110.2 ± 1.7	119.0 ± 1.7
<i>Y. sp.</i>	40.0 ± 1.6	38.4 ± 1.6	96.0 ± 1.6	115.0 ± 1.6	108.8 ± 1.7

*.- Desviación Típica de la Media

Una vez habiendo determinado las CMI se realizó un promedio y se determinó la cantidad de extracto que correspondía al 25, 50 y 75% (Tabla 11). Estas últimas concentraciones se utilizaron para la determinación de los efectos de los extractos sobre el crecimiento en medio ICC y la producción de fosfolipasa.

Tabla No. 11.- Concentraciones usadas en la determinación del efecto de extractos de plantas sobre el crecimiento y la producción de fosfolipasa C en *C. perfringens* tipo A.

Planta	MEDIA DE LA CMI (mg/ml)	25% DE LA CMI (mg/ml)	50% DE LA CMI (mg/ml)	75% DE LA CMI (mg/ml)
(NOMBRE CIENTIFICO)	67.2 ± 1.3*	16.8 ± 1.3	33.6 ± 1.3	50.4 ± 1.3
<i>B. glutinosa</i> Pers.	93.1 ± 1.4	23.3 ± 1.4	46.5 ± 1.4	69.8 ± 1.4
<i>C. zeylanicum</i> Ness.	58.8 ± 1.4	14.7 ± 1.4	29.4 ± 1.4	44.1 ± 1.4
<i>E. aromatica</i> Baill	42.1 ± 1.5	10.5 ± 1.5	21.1 ± 1.5	31.5 ± 1.5
<i>L. tridentata</i> DC Cov.	73.6 ± 1.6	18.4 ± 1.6	36.8 ± 1.6	55.2 ± 1.6
<i>L. involucrata</i> L.	110.6 ± 1.7	27.3 ± 1.7	55.3 ± 1.7	83.1 ± 1.7

*Nota:

Este valor representa la media de las CMI de las cinco cepas usadas con su desviación estandar respectiva.

De manera general, podemos decir que la producción de esta toxina se comportó de la misma forma que el crecimiento de la cepa (Figs. 36 - 95). Encontramos que los extractos de gobernadora inhiben totalmente la producción de la toxina; en la mayoría de las concentraciones probadas de los extractos de lechuguilla, canela y orégano se observó una ligera disminución del crecimiento y de la producción de fosfolipasa, mientras que el extracto de

jarilla no mostró alteraciones en el crecimiento y en la producción de la exotoxina.

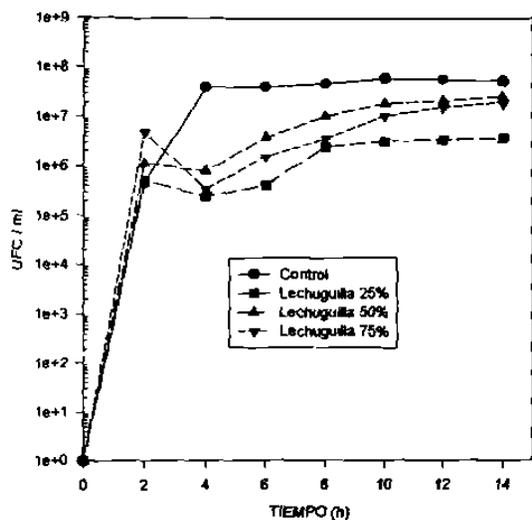


Fig. 36.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio ICC

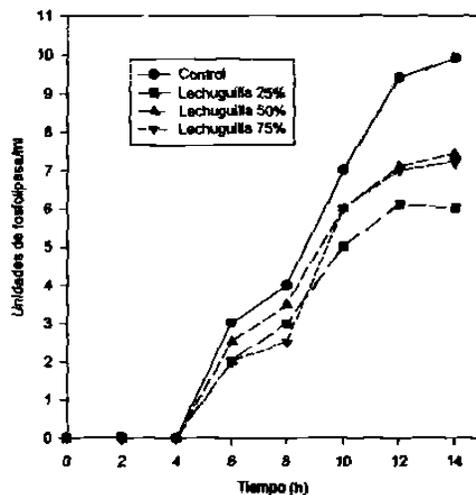


Fig. 37.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

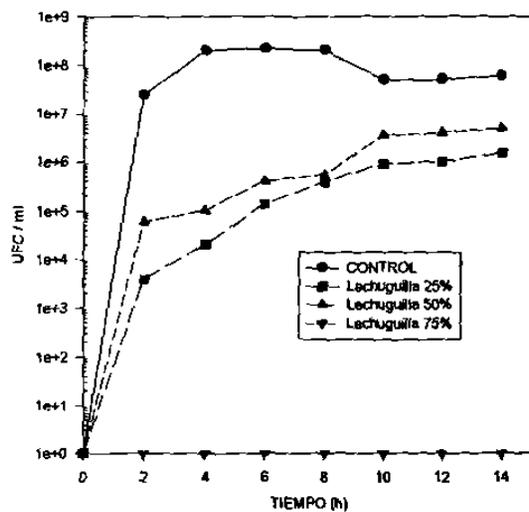


Fig. 38.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

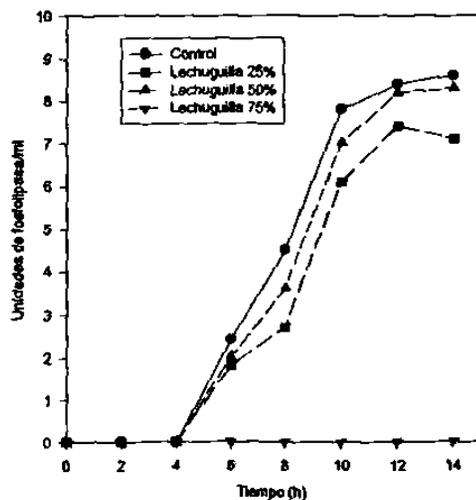


Fig. 39.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

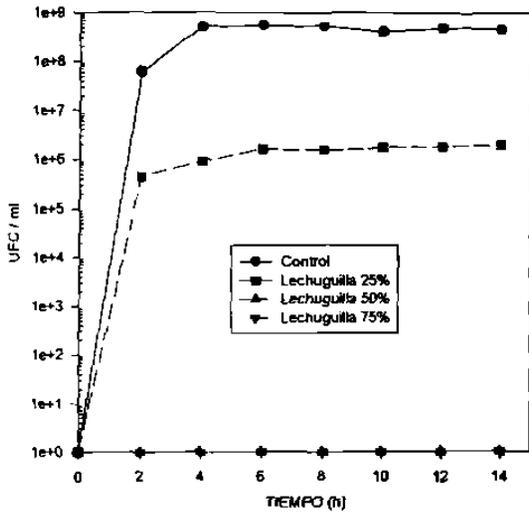


Fig. 40.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio ICC

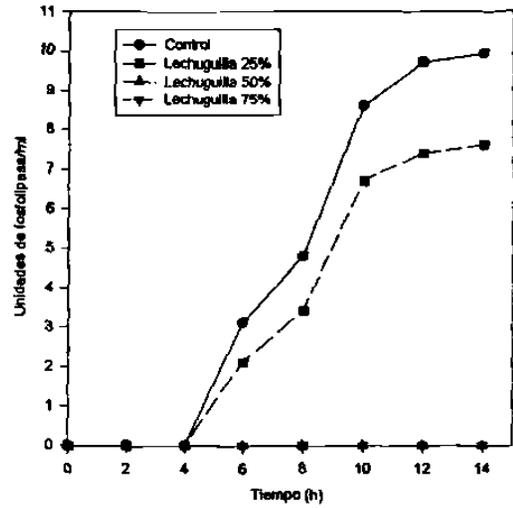


Fig. 41.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8798

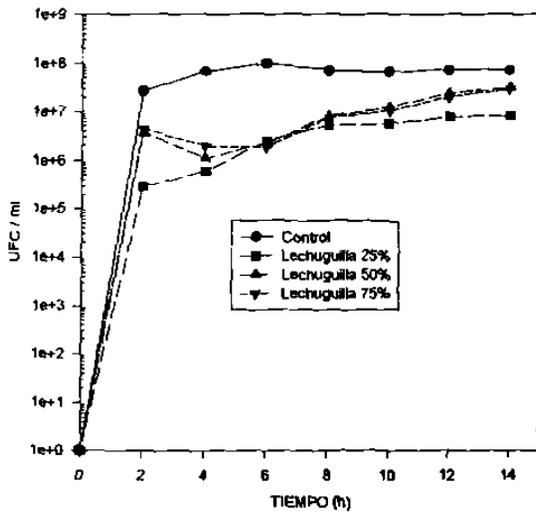


Fig. 42.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio ICC

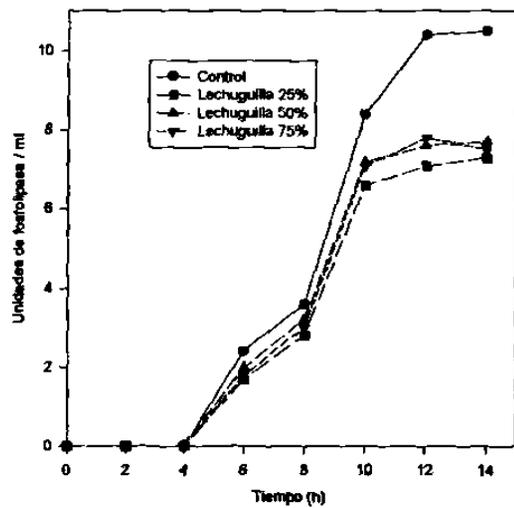


Fig. 43.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* FD-1

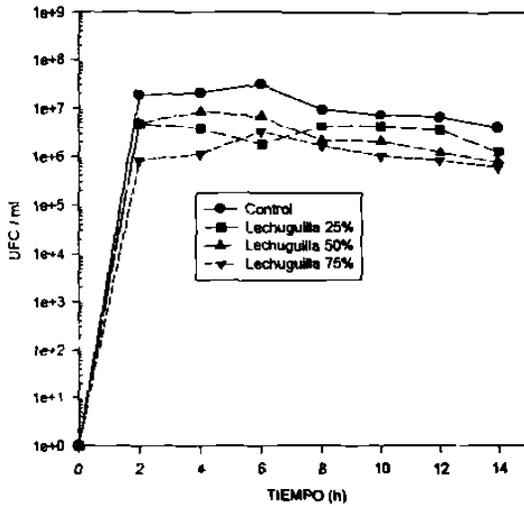


Fig. 44.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en el medio ICC

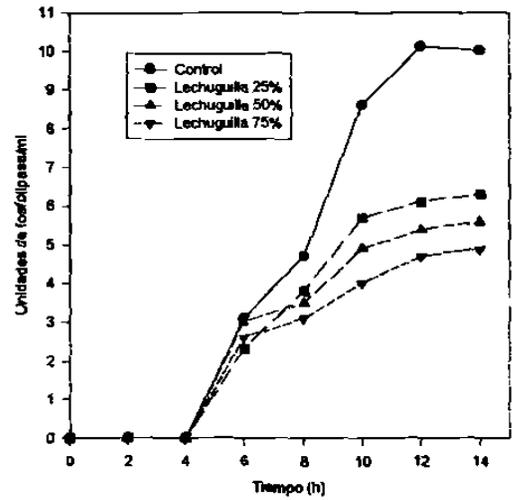


Fig. 45.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de lechuguilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

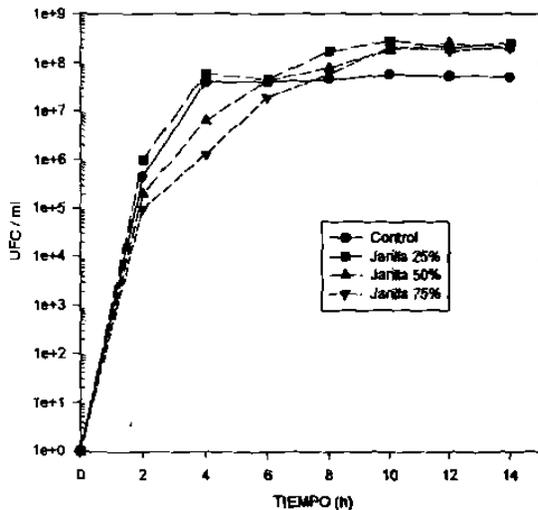


Fig. 46.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio ICC

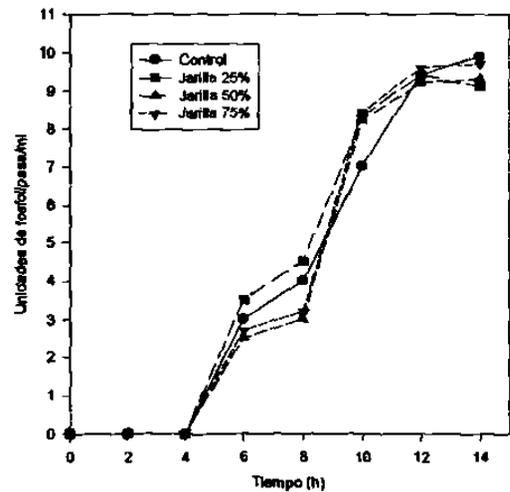


Fig. 47.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

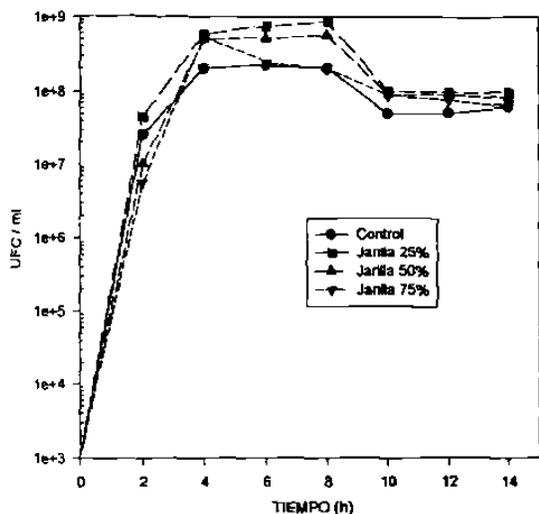


Fig. 48.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

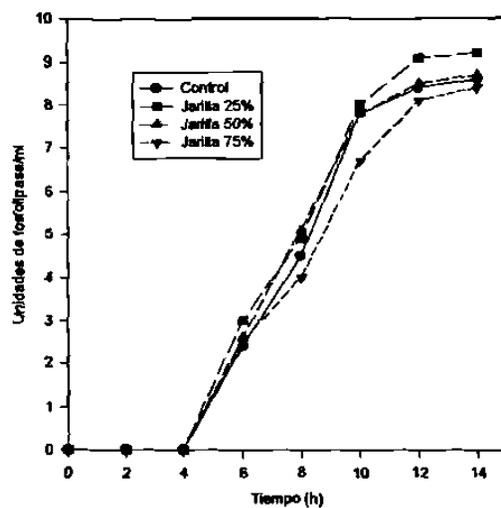


Fig. 49.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

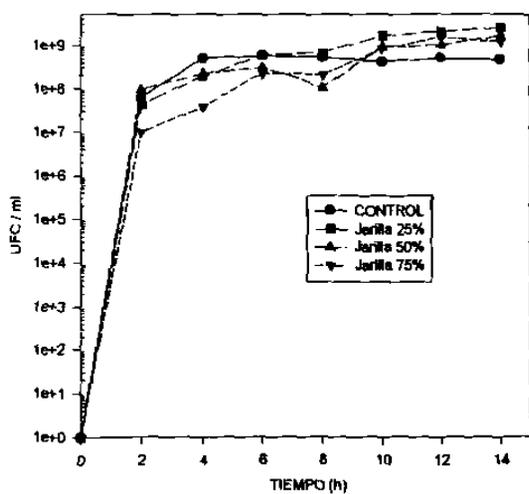


Fig. 50.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio ICC

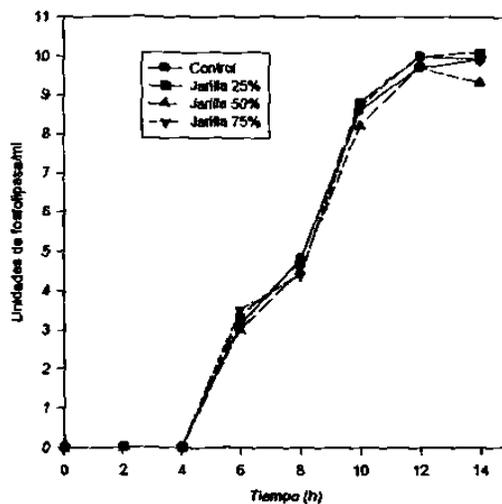


Fig. 51.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8798

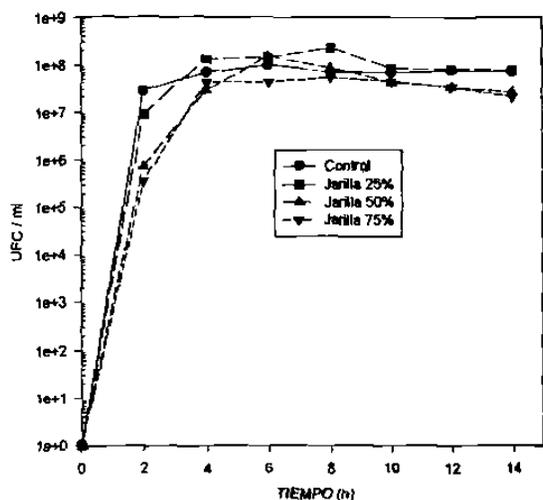


Fig. 52.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio ICC

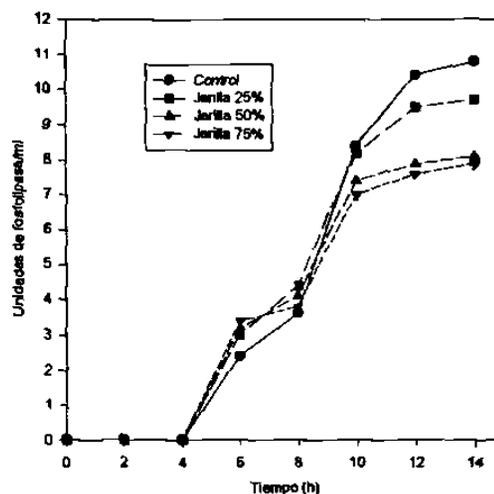


Fig. 53.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* FD-1

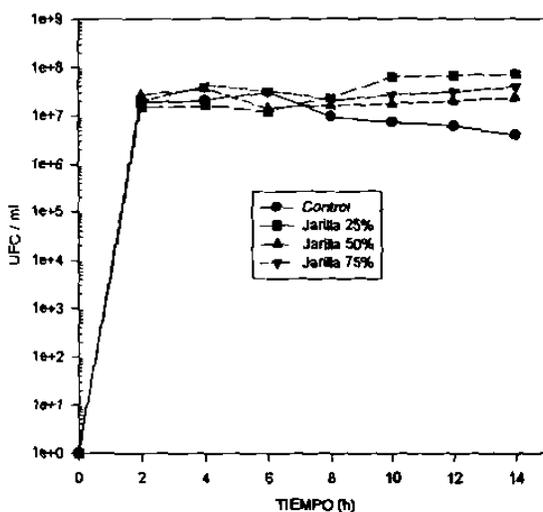


Fig. 54.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en medio ICC

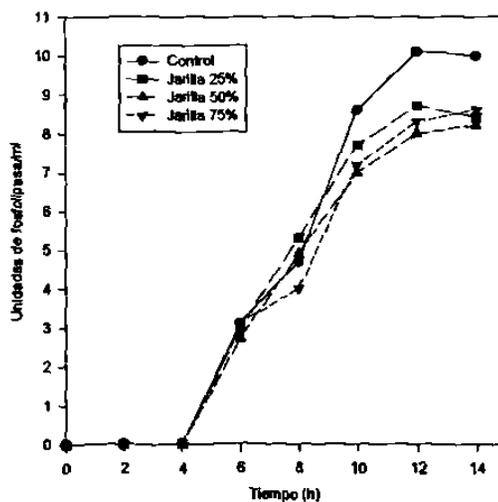


Fig. 55.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de jarilla sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

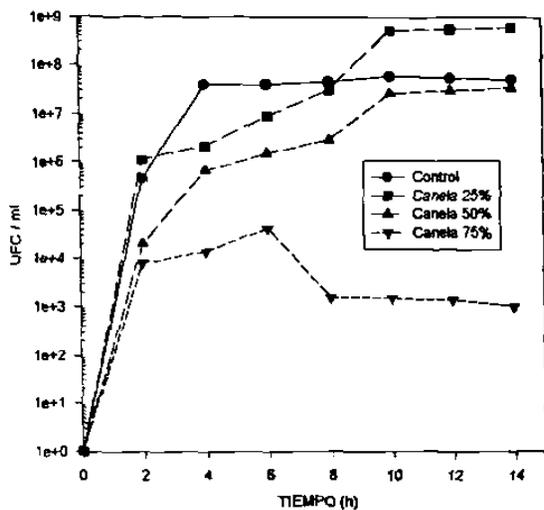


Fig. 56.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio ICC

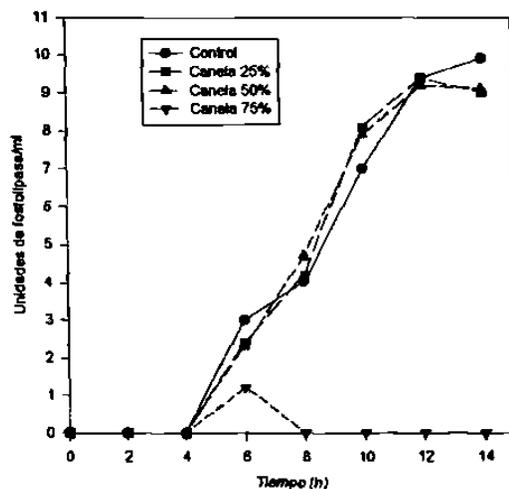


Fig. 57.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

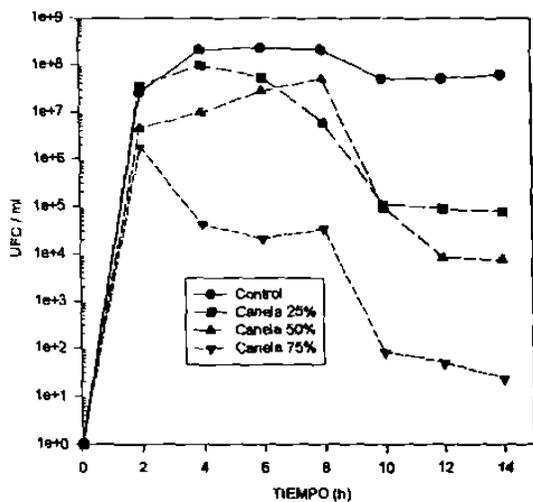


Fig. 58.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

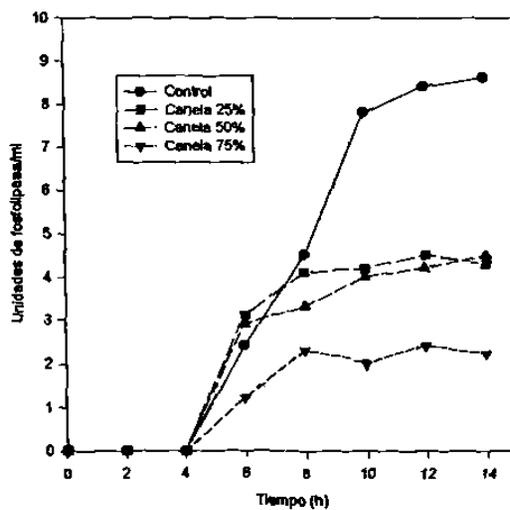


Fig. 59.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

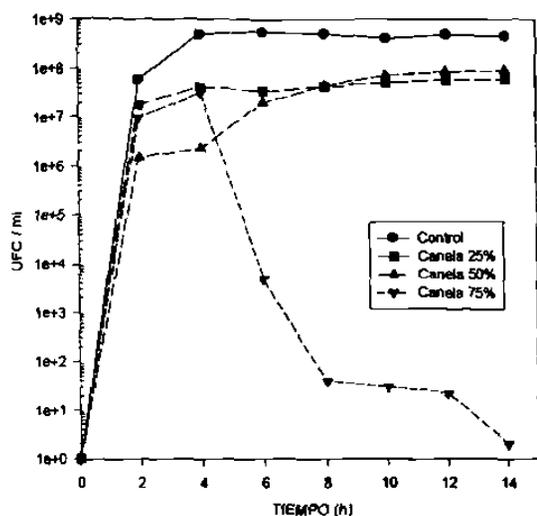


Fig. 60.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre el crecimiento de *C. parfringens* NTCC 8798 en medio ICC

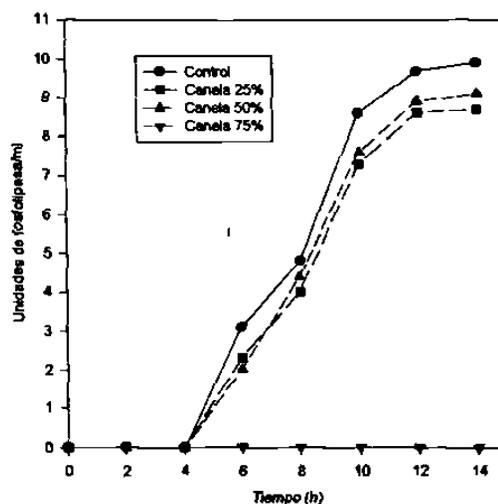


Fig. 61.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de *C. parfringens* NTCC 8798

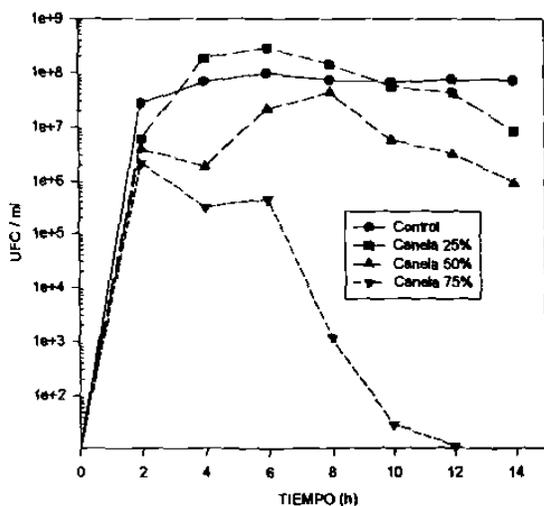


Fig. 62.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre el crecimiento de *C. parfringens* FD-1 en medio ICC

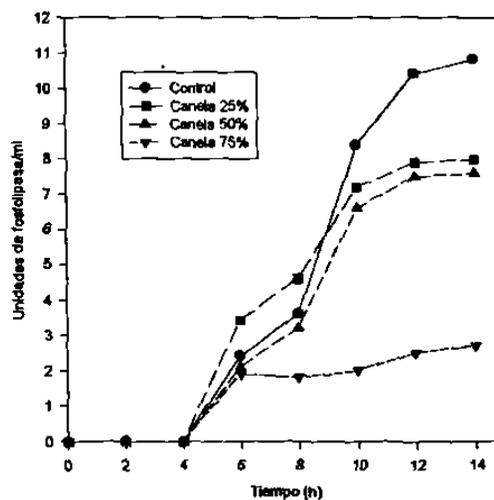


Fig. 63.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de *C. parfringens* FD-1

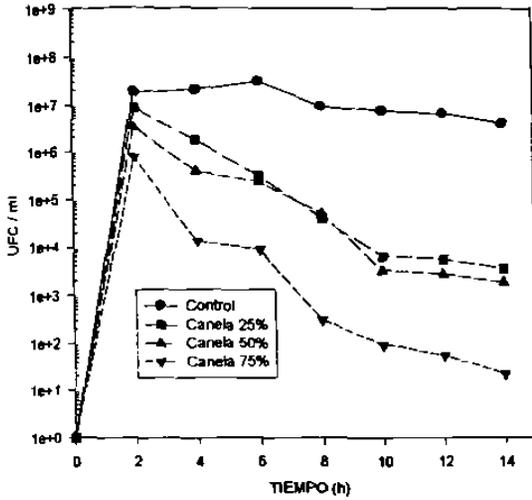


Fig. 64.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en medio ICC

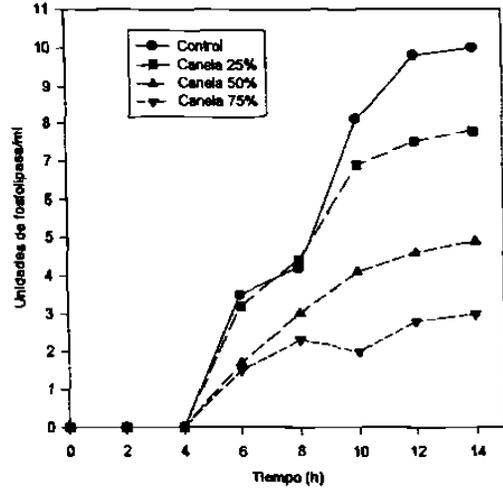


Fig. 65.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de canela sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

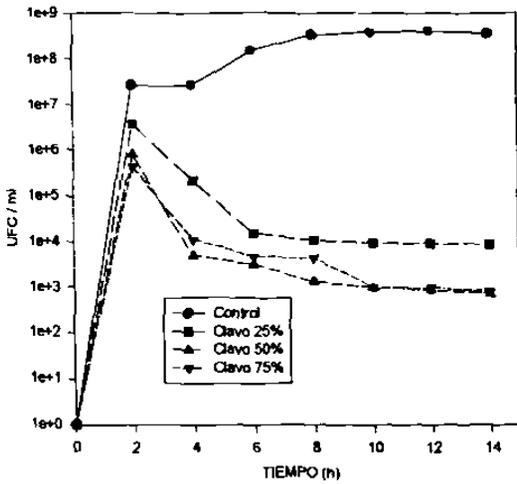


Fig. 66.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en el medio ICC

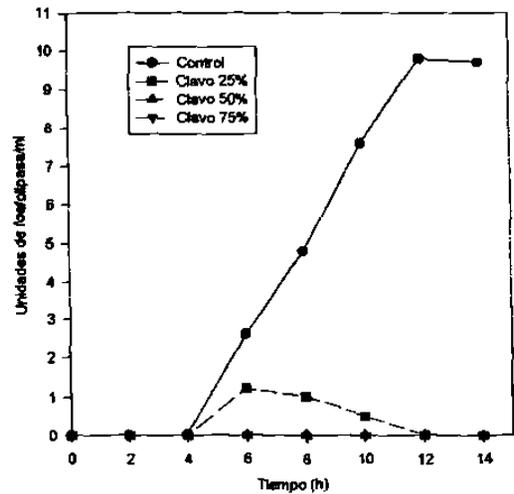


Fig. 67.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

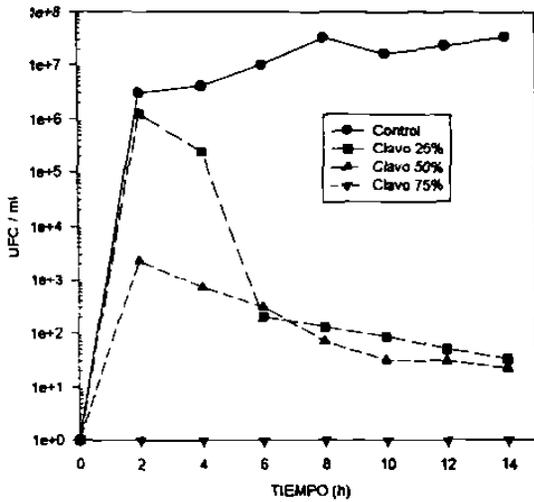


Fig. 68.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

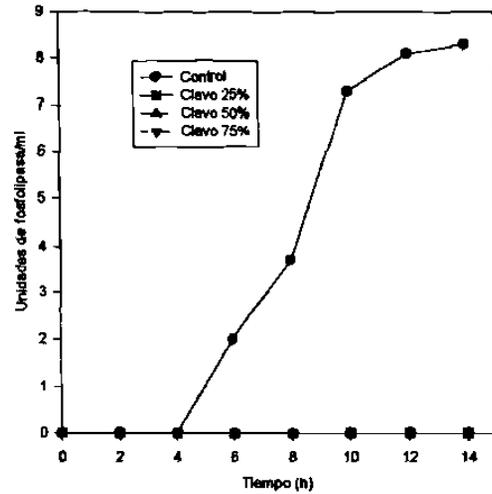


Fig. 69.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

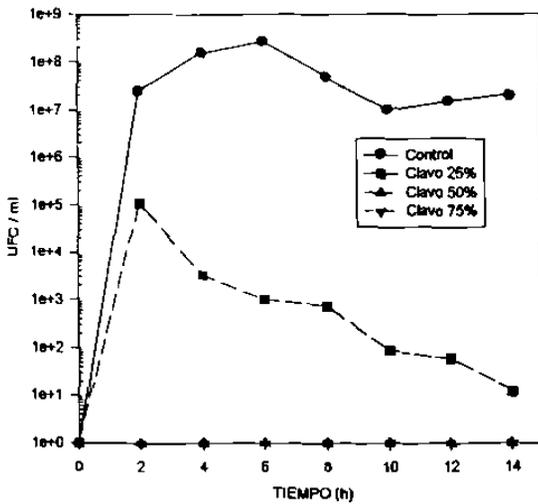


Fig. 70.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio ICC

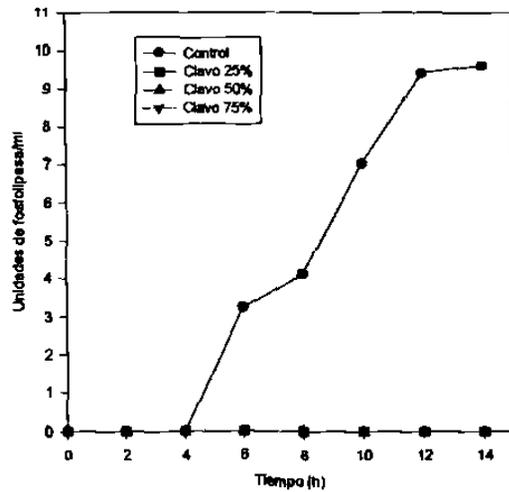


Fig. 71.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8798

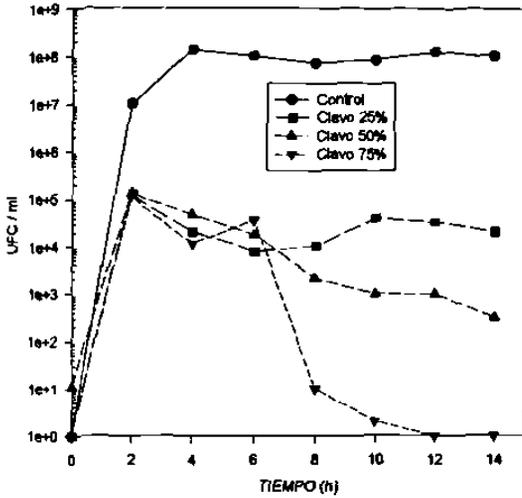


Fig. 72.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio ICC

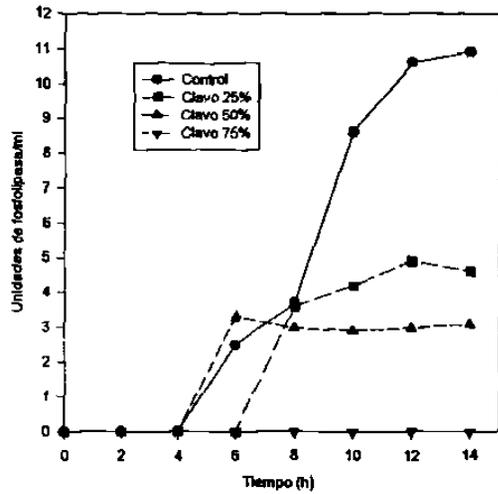


Fig. 73.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* FD-1

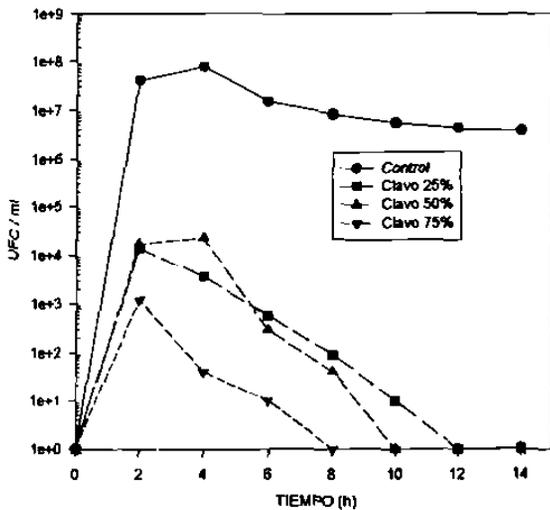


Fig. 74.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en medio ICC

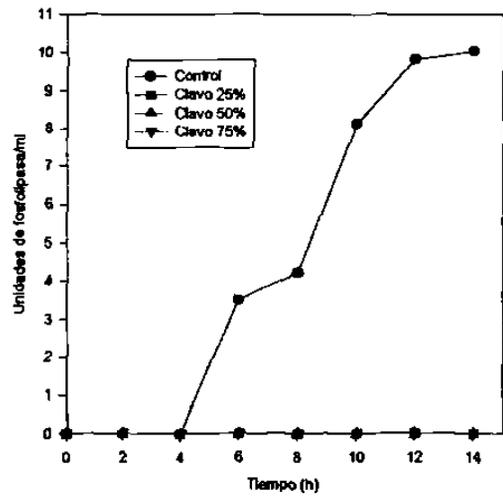


Fig. 75.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de clavo sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

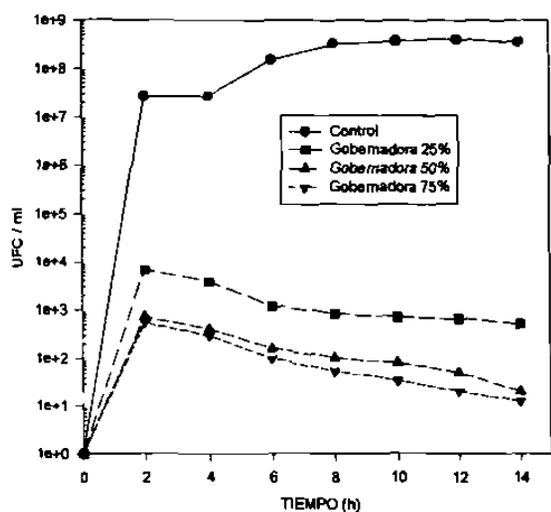


Fig. 76.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8238 en medio ICC

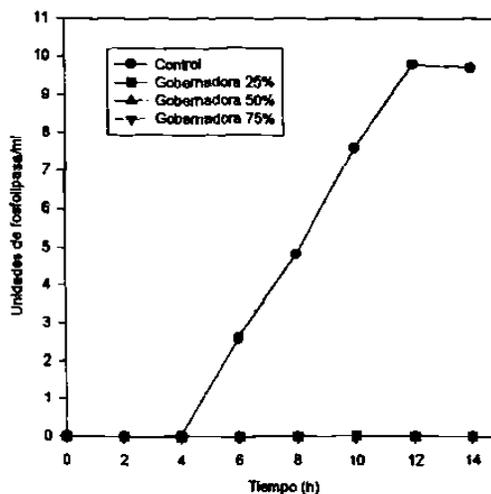


Fig. 77.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

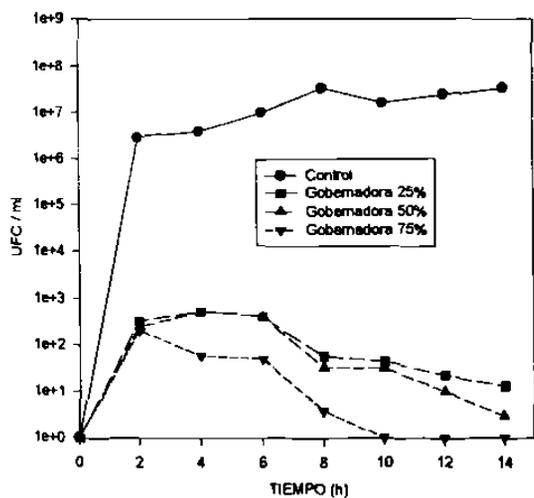


Fig. 78.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

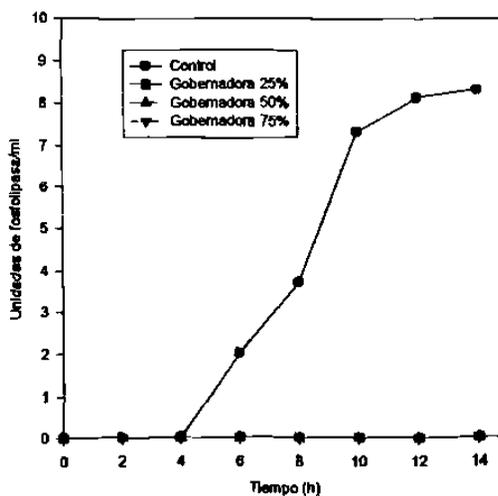


Fig. 79.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

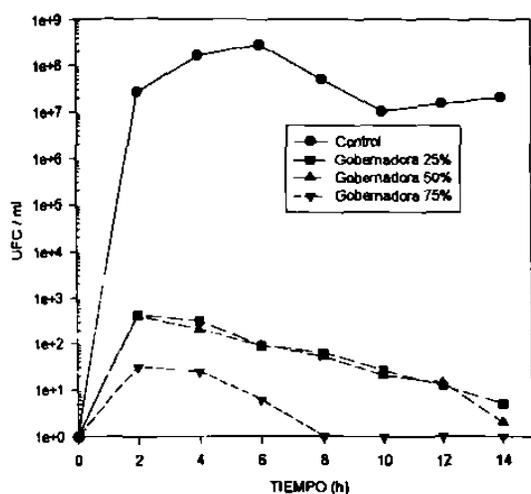


Fig. 80.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio ICC

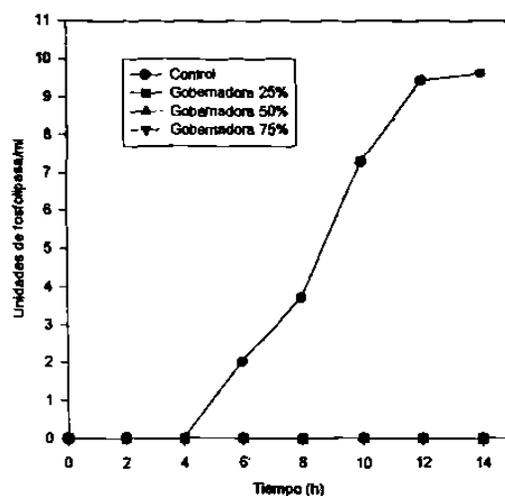


Fig. 81.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8798

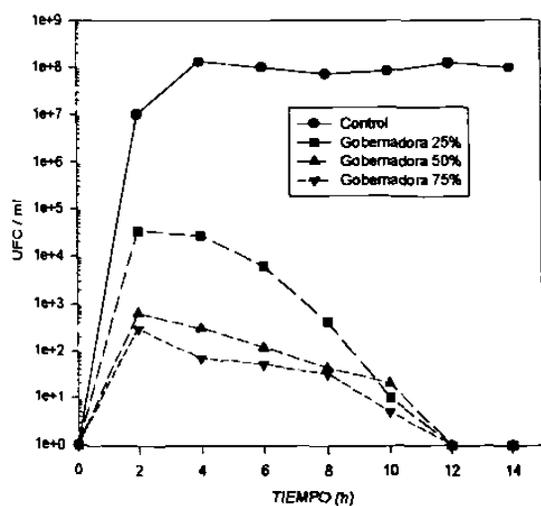


Fig. 82.- Efecto del 25, 50 y 75 de la CMI del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio ICC

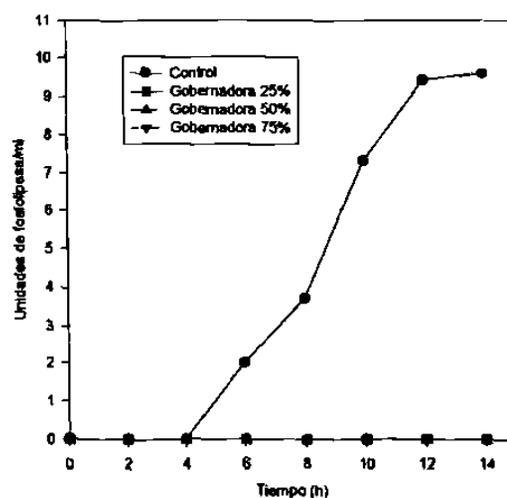


Fig. 83.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* FD-1

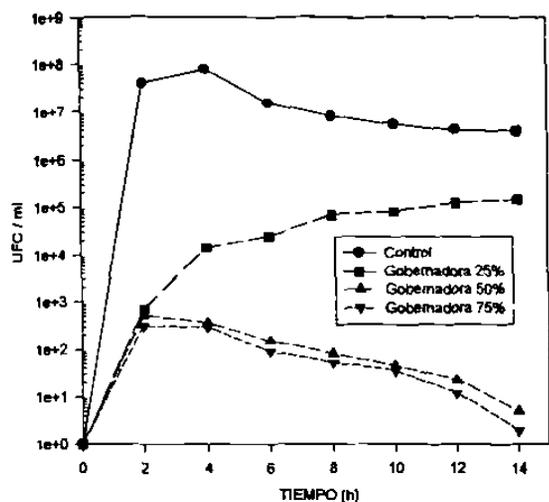


Fig. 84.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en medio ICC

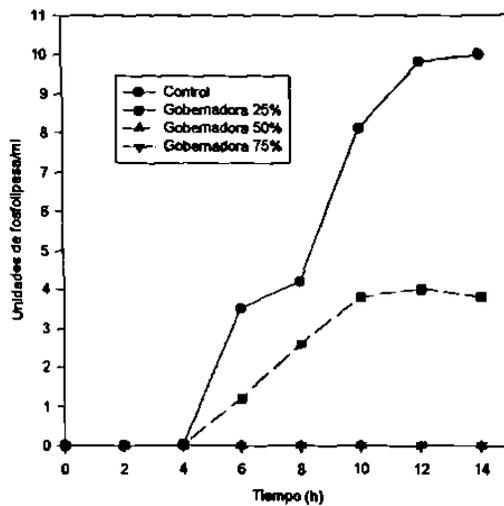


Fig. 85.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de gobernadora sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

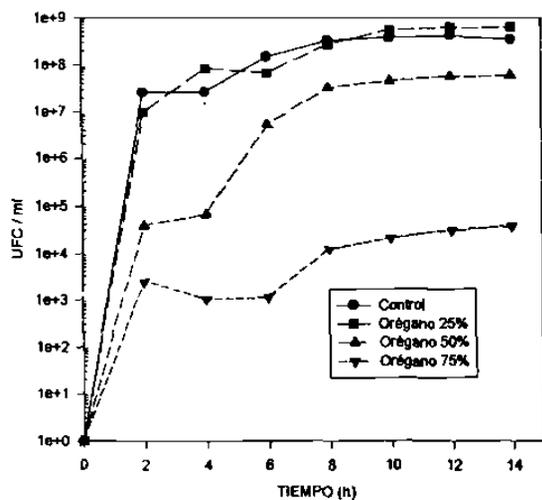


Fig. 86.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre el crecimiento de *C. perfringens* tipo A NCTC 8238 en medio ICC

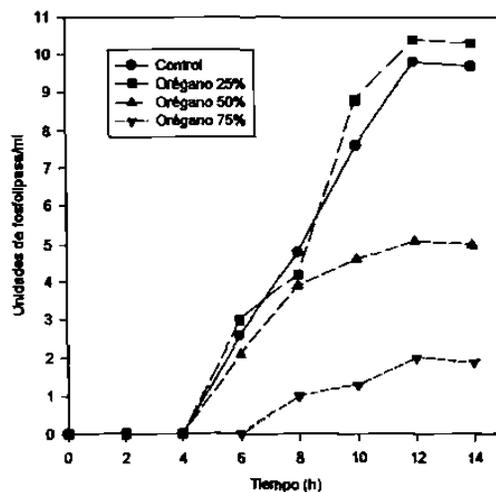


Fig. 87.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8238

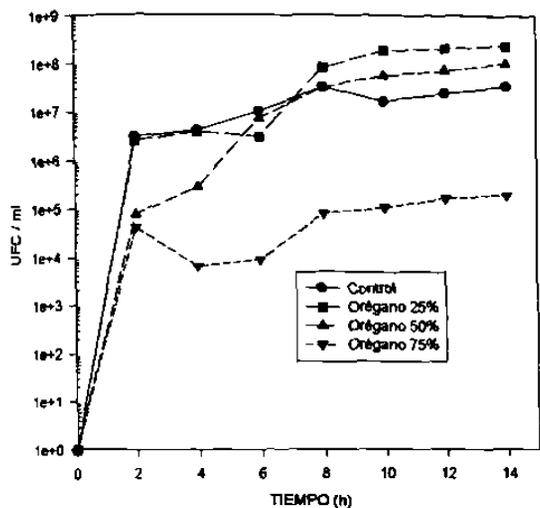


Fig. 88.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8239 en medio ICC

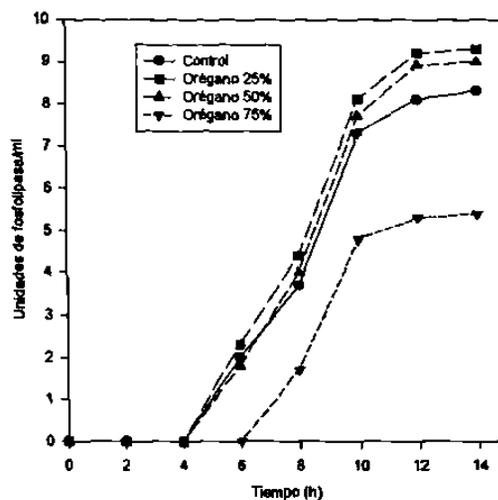


Fig. 89.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8239

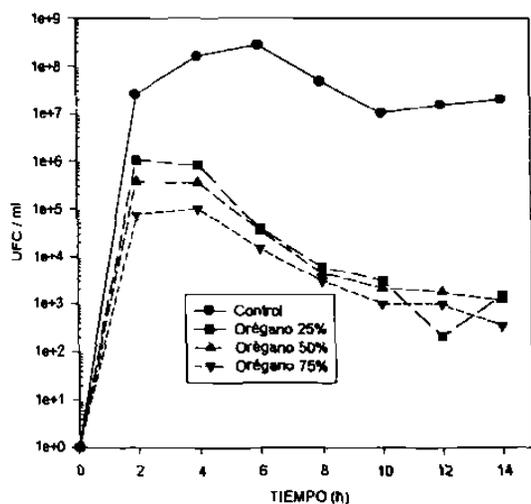


Fig. 90.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre el crecimiento de *C. perfringens* NCTC 8798 en medio ICC

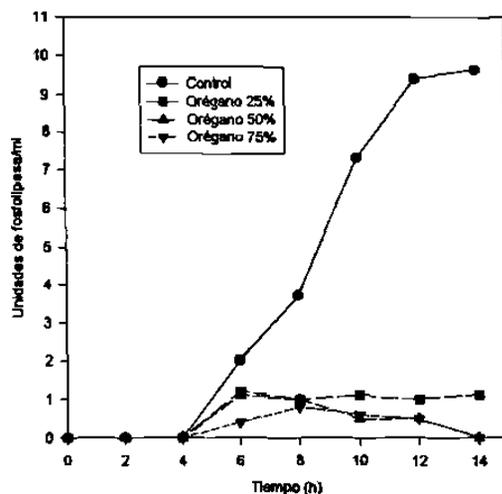


Fig. 91.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* NCTC 8798

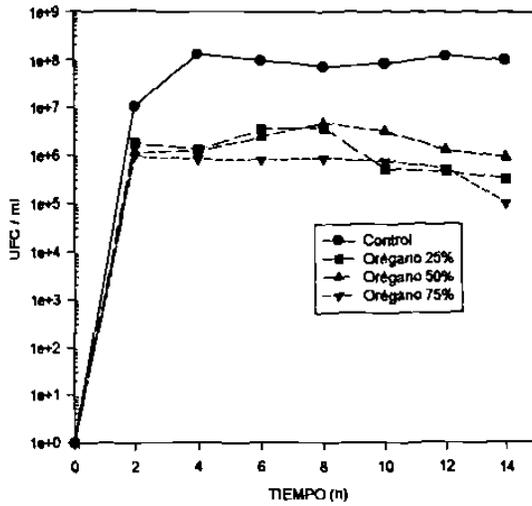


Fig. 92.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre el crecimiento de *C. perfringens* FD-1 en medio ICC

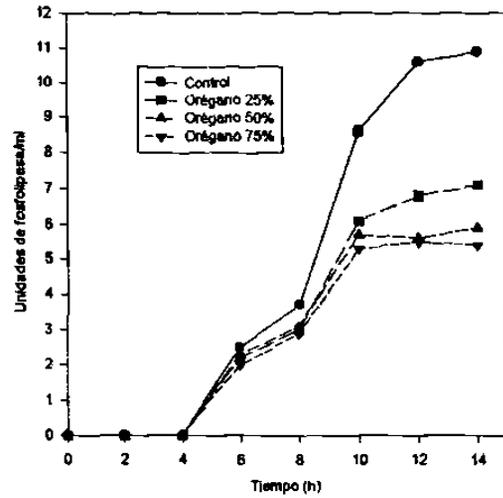


Fig. 93.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano en la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* FD-1

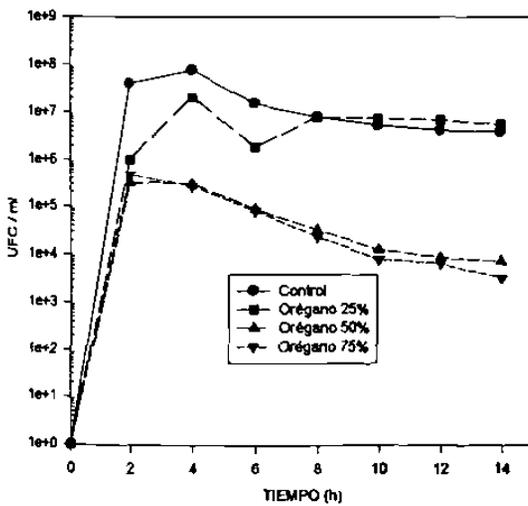


Fig. 94.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre el crecimiento de *C. perfringens* ATCC 3624 en medio ICC

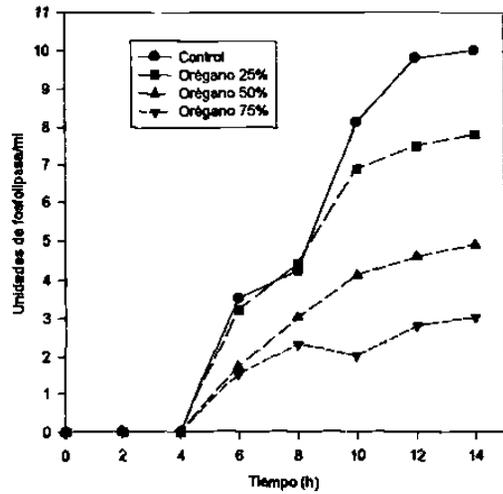


Fig. 95.- Efecto del 25, 50 y 75 % de la CMI del extracto de orégano sobre la producción de fosfolipasa C de *C. perfringens* ATCC 3624

Determinación de la CMI del control positivo

En este caso se utilizó la penicilina en los medios usados (Tabla 12). Encontramos que estas concentraciones variaron de 0.2 µg/ml a 0.35 µg/ml. El análisis estadístico (ANOVA y prueba de Tukey) reveló que no existían diferencias significativas entre las cepas agrupadas por su enterotoxigenicidad o individuales. Sin embargo, las pruebas estadísticas entre los medios mostraron diferencias altamente significativas, con un α de 0.05 %.

Tabla No. 12.- Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) del crecimiento por penicilina G

Medio	Cepas Enterotoxigénicas			Cepas no Enterotoxigénicas	
	CMI (µg/ml)				
	NCTC 8238	NCTC 8239	NCTC 8798	FD-I	ATCC 3624
Müller-Hinton	0.2 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.05	0.25 ± 0.05
Duncan y Strong	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.25 ± 0.05
Infusión Cerebro-Corazón	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05

Nota:

Los experimentos se realizaron al menos por duplicado con tres repeticiones cada uno.

DISCUSION

Las plantas son una importante fuente de antimicrobianos y en ultimas fechas, compuestos aislados de estas, se utilizan en la preservación de alimentos, como antimicrobianos, etc.. En un estudio reciente se demostró que un número considerable de plantas utilizadas en la medicina tradicional presentan un efecto antimicrobiano contra diversos microorganismos cusantes de enfermedades gastrointestinales (Sánchez-García, C.A. 1995). En este trabajo nos enfocamos a determinar los efectos de algunos de esos extractos de plantas en el crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *C. perfringens* tipo A .

En este trabajo se observó que existen diferencias significativas en las CMI que inhibieron el crecimiento en los distintos medios usados. Estas diferencias se pueden deber a la composición de los medios utilizados, debido a que las concentraciones mínimas aumentaban a razón de la cantidad de nutrientes disponibles en el medio; por ejemplo: De los extractos probados sobre el crecimiento de este patógeno el proveniente de *Yuca sp.* fue el que presentó la CMI mas baja para todas las cepas, en el medio de Müeller-Hinton (M-H), pero esto no fue así en los otros medios, en los que presentó CMI mayores.

Se determinó estadísticamente que las CMI mas bajas para el crecimiento se obtuvieron en el medio de M-H de los tres probados; seguido por el medio de D-S, y el que presentó las CMI mas altas fue el de ICC. Aún así,

se determinó que todos los extractos probados presentaron un efecto inhibitorio del crecimiento y que, en la mayoría de los casos, este era dependiente de las concentraciones del extracto usado, es decir, a mayor cantidad de extracto mayor la inhibición del crecimiento mostrada.

En el medio de D-S se determinó el efecto de los extractos sobre la formación de esporas y la producción de enterotoxina; aquí se observó que no existían diferencias significativas entre las CMI para el crecimiento y la formación de esporas, más sin embargo, al manejar cada extracto por separado las CMI que inhiben la formación de esporas resultan ser, en su mayoría, menores a las obtenidas para el crecimiento en este medio. Esto concuerda con trabajos realizados en el género *Bacillus* donde se menciona que algunos compuestos procedentes de plantas inhibían el proceso de esporulación pero no interferían con el crecimiento de la bacteria a concentraciones iguales (Fleming, H.P. et al 1973).

El extracto de lechuguilla mostró una fuerte inhibición de la formación de esporas en todas las cepas de *C. perfringens*. Los de laurel y de orégano inhibieron la formación de esporas en forma moderada pero solo en las cepas enterotoxigénicas, el resto de los extractos no mostraron una inhibición de este proceso o lo hicieron en forma muy ligera. Sin embargo, se observó que en algunos de los extractos a concentraciones menores a la mínima, aumentaban la formación de esporas del microorganismo, aunque este comportamiento no fue estadísticamente significativo.

En este microorganismo la producción de enterotoxina se relaciona de una manera estrecha con el proceso de esporulación (Lund, M.B. 1990); esto se reafirmó durante este trabajo puesto que una inhibición o aumento de la formación de esporas ocasionaba un efecto similar en la producción de enterotoxina, como se observó en los extractos de la lechuguilla y orégano, como inhibidores, y de forma contraria en el de hojaseñ.

Por otra parte, se observó que los extractos de orégano y canela solo inhibían la producción de enterotoxina en algunas cepas pero no la formación de esporas. Lo cual fue corroborado por los estudios de Nychas, G.I. et al en 1991 y Tranter, H.S. et al en 1993, donde se demostró que algunas sustancias provenientes de plantas pueden inhibir la secreción o formación de toxinas bacterianas.

También determinamos que algunos extractos en concentraciones menores a la CMI lograban inhibir la formación de esporas pero no la producción de toxina, como el caso de los extractos de laurel. Un efecto similar ha sido encontrado en hongos del género *Aspergillus* donde se ha visto que la producción de aflatoxinas totales aumenta al colocar a el hongo en concentraciones de antifúngicos menores a la mínima inhibitoria (Badii, F. and Moss, M.O. 1988); los autores mencionan que esto se debe a que el hongo se encuentra en una situación de estrés que lo obliga a aumentar la producción de este tipo de metabolitos, tal vez como un sistema de defensa o de reparación.

De igual forma, se determinó el efecto de los extractos sobre el crecimiento en el medio de ICC. En este caso los extractos que mostraron una fuerte inhibición del crecimiento fueron los de clavo y de gobernadora, seguidos por los de canela y orégano con una inhibición moderada. El extracto de lechuguilla no mostró inhibición en las concentraciones probadas; mientras que el extracto de jarilla aumentó el crecimiento del microorganismo. La producción de fosfolipasa C en este medio fue afectada por los extractos de forma similar que el crecimiento. Se ha visto que la cantidad de toxina depende del número de células presentes (Mollby, R. *et al* 1976) por lo que pensamos que las reducciones observadas en el crecimiento de *C. perfringens* disminuyeron la cantidad de esta enzima mas que una inhibición en la producción de esta.

Por lo que nosotros podemos afirmar que los extractos acuosos de algunas plantas de la región presentan efectos inhibitorios sobre el crecimiento, la formación de esporas y la producción de toxinas de *C. perfringens* tipo A por lo que podrían ser una alternativa como preservadores de alimentos o bien para el tratamiento de la diarrea infecciosa.

Sin embargo es necesario realizar estudios mas profundos con el fin de determinar un sistema de solventes para mejorar la extracción del compuesto activo y de igual forma caracterizarlo; para seguir estudios farmacologicos y de toxicidad en lineas celulares e "in vivo" con animales de laboratorio; pruebas de palatabilidad, resistencia al manejo del alimento y vida de anaquel del

compuesto activo puro y mezclado con el alimento, dependiendo de la utilidad propuesta.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo nos muestran que:

1) Los extractos acuosos de las plantas analizadas originaron una inhibición del crecimiento, de la formación de esporas y de la producción de toxinas de *Clostridium perfringens* tipo A.

2) Las CMI del crecimiento de la bacteria varían de manera significativa dependiendo de el medio que se utiliza.

3) El proceso de esporulación es inhibido a concentraciones menores de extracto que el de crecimiento.

4) La mayoría de los extractos disminuye de forma considerable la formación de esporas y la producción de enterotoxina de este patógeno.

5) La producción de fosfolipasa C fue afectada por los extractos en forma paralela al crecimiento de la bacteria.

6) De los extractos analizados la CMI del crecimiento mas baja fue mostrada en el medio de M-H por el extracto de yuca (1.65 mg/ml) y la mas alta fue en el medio de ICC por el extracto de laurel (141 mg/ml).

LITERATURA CITADA

Alcocer, J.M. 1992. Remedios Naturales. 1ª ed. Anaya editores S.A. p. 7 -11.

Ansari, A.A. and A.K. Shrivastava. 1991. The effect of eucalyptus oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Letters Appl. Microb. 13: 75 - 77.

Archer, D.L. and J.E. Kvenberg. 1985. Incidences and cost of food-borne diarrheal disease in United States. J. Food Protec. 48: 887-894.

Atkinson, N. 1946. Antibacterial activity in members of the native Australian flora. Nature 158: 876.

Banwell, J.G. 1990. Pathophysiology of diarrheal disorders. Rev. Infect. Dis, 12: S30.

Bartholomew, B.A. and M.F. Stringer. 1983. Observations on the purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin and the production of a specific antiserum. FEMS Microbiol. Lett. 18: 43.

- Bean, N.H., P.M. Griffin, J.S. Gloding and C. Bolviev. 1990. Foodborne disease outbreaks five years summary, 1983 - 1987. *J. Food Protect.* 53: 711 - 728.
- Betto, P., C.G. Casinovi, R. Gabriele, G. Grandolini and F. Menichini. 1988. Estudio sistemático de los componentes menores de la *Artemisia arborescens* L. (Compositae). *Rev. Latinoamer. Quím.* 19:40 - 42.
- Bilgrami, K.S., K.K. Sinha and A.K. Sinha. 1992. Inhibition of aflatoxin production & growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion & garlic extracts. *Indian J. Med. Res.* 96: 171 - 175
- Block, E. 1983. *Química del ajo y la cebolla.* Prensa Científica p. 86 - 92
- Borriello, S.P., A.R. Welach, H.E. Larson, F. Barclay, M.F. Stringer and B. Bartholomew. 1984. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* 1: 305 .
- Borriello, S.P., F.E. Barclay, A.R. Welch, M.F. Stringer, G.N. Watson, R.N. Williams, D.V. Seal and K. Sullens. 1985. Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *J. Med. Microbiol.* 20:363
- Brock, T.D. 1987. *Biología de los Microorganismos.* Ed Prentice - Hall. p 624 - 633

Bushnell, O.A., M. Fukada and T. Makinodan. 1950. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pacific Sci.* 4: 167.

Caceres, A., O. Cano, B. Samayoa and L. Aguilar. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against bacteria. *J. Ethnopharmacology* 30: 55 -73.

Carlson, H.S., H.G. Douglas and J. Robertson. 1948. Antibacterial substances separated from plants. *J. Bacteriol.* 55: 241.

Carson, C.F. and T.V. Riley. 1993. A review: Antimicrobial activity of essential oil of *Malueca alternifolia*. *Lett. Appl. Microbi.* 16: 49 - 55.

Centers for Disease Control. March 1990. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. In *CDC Surveillance Summaries*, . *MMWR* 1990; 39(No. SS-1): 15

Chung, K.-T., W.R. Thomasson and C.D. Wu- Yuan. 1990. Growth inhibition of selected food-borne bacteria, particularly *Listeria monocytogenes*, by plant extracts. *J. Appl. Bact.* 69: 498-503.

- Craven, S.E., I. Blankenship and J.L. McDonel. 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type a in cooked chicken. Appl. Environ. Microbiol. 41:1184
- Colowick, S.P. and N.O. Kaplan. 1988. Methods in Enzymology. 1ts. ed. S. Harshman edit. Academic Press. p. 91 - 94, 293 - 297.
- Conner, D.E. 1993. Antimicrobials in foods. 2nd. ed. Ed. Marcel Dekker,Inc. p. 441-468.
- Delaha, E.C. and V.F. Garagusi. 1985. Inhibition of Mycobacteria by garlic extract (*Allium sativum*). Antimi. Agents and Chemothe. 27: 485
- Downum, K.R. 1986. Photoactivated biocides from higher plants. Nat. Resistance of Plants to Pesticides. ACS Symposium series.p 197- 205
- Downum, K.R., S. Villegas, E. Rodriguez and D.J. Keil. 1989. Plant Photosensitizers: A survey of their occurrence in arid and semiarid plants from North America. J. Chem. Ecol. 15: 345 - 355.
- Duncan, C.L., D.H. Strong and M. Sebald. 1972. Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. J. Bacteriol. 110: 378.

Dyche-Teague, F.C. 1924. Effect of essential oils used in perfumery on growth of pathogenic bacteria. Perf. Essent. Oil Record. 1:6.

Flemming, H.P., W.M. Walter and J.L. Etchels. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. Appl. Microb. 26: 777 -782.

García-Alvarado, J.S. 1990. Estudio sobre algunos eventos metabólicos relacionados con la producción de enterotoxina y la esporulación de *Clostridium perfringens* Tipo A. Universidad Autónoma de Nuevo León (Tesis). p 3 - 12.

García-Alvarado, J.S., M.A. Rodríguez and R.G. Labbé. 1992a. Influence of elevated temperature on starch hydrolysis by enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiology. 58: 326 - 330.

García-Alvarado, J.S., R.G. Labbé and M.A. Rodríguez. 1992b. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43°C. Appl. Environ. Microbiology. 58: 1411-1414.

- Garrido-Fernandez, A. and R.H. Vaugh. 1978. Utilization of oleuropein by microorganisms associated with olive fermentation Can. J. Microbiol. 24: 680 - 684.
- Ginesta-Peris, E., F.J. García-Breijo and E. Primo-Yúfera. 1994. Antimicrobial activity from *Xanthium spinosum* L. Lett. Appl. Microbi. 13: 206 - 208.
- Granum, P.E. and O. Harbitz. 1984. A circular-dichroism study of the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A J. Food. Biochem 9: 137-146.
- Guerrant, R.L., J.M. Huges, N.L. Lima and J. Crane. 1990. Diarrhea in development and developing countries: Magnitude special settings and etiologies. Rev. Inf. Dis. 12: S41 - S50.
- Hatheway, C.L., D.N. Whaley and V.R. Dowell. 1980. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. Food Technol. 34:77.
- Hayes, L.E., 1946. Survey of higher plants for presence of antibacterial substances. Bot. Gaz. 108: 408.

- Heredia-Rojas, N.L. 1996. Caracterización de la Respuesta del Choque Térmico de *Clostridium perfringens* tipo A. Universidad Autónoma de Nuevo León; Facultad de Ciencias Biológicas. (Tesis) p 37 - 39.
- Holland, K.T., J.S. Knapp and J.G. Shoosmith. 1978. Anaerobic bacteria Chapman and Hall Publishers, New York. pp 154 - 158.
- Huddleston, I.F., J. Dufraim, K.C. Barrowns and M. Giefel. 1944, Antibacterial substances in plants. J. Am. Vet. Assoc. 105: 394.
- Humphrey, E. M. 1930. A new Australian germicide. Med. J. of Australia. i: 417 - 418.
- Ikan, R. 1991. Natural products: a laboratory guide. 2nd edition. Academic press, Inc. p 54 - 66.
- Isshiki, K., K. Tokouka, R. Mori and S. Chiba. 1992. Preliminary examination of allyl isothiocyanate vapor for food preservation. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 1476 - 1477.

- Jolivet-Reynau, C., H. Moreau and J.E. Alouf. 1988. Assay Methods for Alpha Toxin from *Clostridium perfringens* Phospholipase C. p 293- 298 *In* Harsman, S. (Ed) Methods in Enzimology. Volume 165. Microbial toxins: Tools in Enzimology. Academic Press Inc. San Diego; California.
- Kumate, J. and A. Isibasi 1986. Pediatric diarrheal diseases: a global perspective. *Pediatric Infect. Dis.* 5(1): S 21.
- Krug, E.L. and C. Kent. 1984. Phospholipase C from *Clostridium perfringens*. Preparation and characterization of homogeneous enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 400 - 410.
- Labbé R.G. 1980. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. *Food Technol.* 34: 88 .
- Labbé, R.G. 1988. Bacterial associated with foodborne diseases: *Clostridium perfringens* *Food Tech.* 42: 15 - 16.
- Labbé, R.G. 1989. *Clostridium perfringens*. In Doyle, M.P. (ed). Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York-Basel.
- Labbé, R.G. 1991. *Clostridium perfringens*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 711.

- Larson, H.E. and S.P. Borriello. 1988. Infectious diarrhea due to *Clostridium perfringens*. J. Infec. Dis. 157: 390 .
- Lugo, E.E. 1992. Introduccion al estudio de las plantas medicinales, la interaccion del medio con la cultura. Universidad Autónoma de Chapingo (Tesis).
- Lund, M.B. 1990. Foodborne disease due *Bacillus* and *Clostridium* species. In: Foodborne Illness. Lancet 982 - 986.
- Macht, D.I. and W.M. Kunkel. 1920. Antimicrobial efect of plants of mediterranean area. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 18: 68
- Magaña, R.H. and M.G. Jorda, 1991. Plantas medicinales. 5ta. ed. Arbol editorial, S.A.de C.V. p. 7-8.
- Malcolm, S.A. and E.A. Sofowora. 1969. Antimicrobial activity of selected nigerian folk remedies and their constituent plants. Lloydia. 32: 512.
- McClane, B.A., P.C. Hanna and Wnek, A.P. 1988. Mini-review: *Clostridium perfringens* enterotoxin. Microbial Pathogenesis. 4: 317 - 323.

- McDonel, J.L. 1986. Toxins of *Clostridium perfringens* type A, B, C, D and E, p 477 - 517. In Dorner, F. and Drews (Ed). Pharmacology of bacterial toxins. Oxford Pergamon Press, London
- Mitscher, L.A., W.-N. Wu, R.W. Doskotch and J.L. Beal. 1971. Antimicrobial agents from higher plants. *Thalictrum rugosum*. New bisbenzylisoquinoline alkaloids active against *Mycobacterium smegmatis* Chem. Commun p. 589.
- Mitscher, L.A., R.-P. Leu, M.S. Bathala, W.-N. Wu and J.L. Beal. 1972. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and Methodology. Lloydia 35: 157-166.
- Moat, A.G. and J.W. Foster. 1988. Microbial Physiology. John Wiley & Sons. New York - New York. p: 562 - 568.
- Mollby, R., T. Holme, C.E. Nord, C.J. Smith and T. Wadstorm. 1976. Production of phospholipase C (alpha-toxin), hemolysis and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. J. Gen microbiol. 96: 137 - 144.
- Morris, A., A. Khettry and E.W. Seitz. 1978. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J. American. Oil Chem. Soc. 56: 595

- Murrel, T.G.C., B.G. Ingham, J.R. Moss and W.B. Taylor. 1987. A hypothesis concerning *Clostridium perfringens* type A enterotoxin (CPE) and sudden infant death syndrome (SIDS). *Med. Hypothesis*. 22: 401 .
- Nguyen-the, C. and B.M. Lund. 1992. An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microb.* 73: 23 - 30
- Naik, H.S. and C.L. Duncan. 1977. Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counterimmunoelectrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:125.
- Nicoletti, M., M. Serafini and J.F.C. Albuquerque. 1988. A new diterpene from *Echinolena Inflexa*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 19: 13 - 14.
- Nychas G.J. and R.G. Board. 1991. Enterotoxin B production and physicochemical changes in extracts during the grow of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiol.* 8: 105 - 117.
- Oblinger, J.L. 1988. Bacteria associated with foodborne diseases. *Food Technol.* 42 :4 .

Osborn, E.M. 1943. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *Brit. J. Exp. Pathol.*24: 227.

Pearson L.J. and E.H. Marth. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cocoa in a broth medium and neutralization of this effect by casein. *J. Food Prot.* 53: 38.

Penfold, A.R. and F.R. Morrison. 1937. Some notes on the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Australian J. Pharmacy* 18: 274 - 275.

Rios, J.L., M.C. Recio and A. Villar. 1987. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of literature. *J. Ethnopharmacology.* 23:127- 149.

Robbins; S.L. and R.S. Cotran. 1984. *Patología estructural y Funcional.* 3^o Edición. Ed. Interamericana. p. 325 - 377.

Robinson, J. and M. Messer. 1969. *Clostridium perfringens* food poisoning-Texas. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 18: 20.

Rzedowski, J. 1988. *Vegetación de México.* Instituto Politécnico Nacional. Escuela de Ciencias Biológicas. México.

- Sánchez-García. C.A. 1995. Efecto de extractos de 33 plantas sobre el crecimiento de 11 especies bacterianas causantes de enfermedades gastrointestinales. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. (Tesis de licenciatura)
- Sanders, S. and R. Hutcheson Jr. 1974. *Clostridium perfringens* food poisoning-Tennessee. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 23: 19.
- Sato, H., J. Chiba and Y. Sato. 1989. Monoclonal antibodies against alpha toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiology Letters* 59: 173 - 176.
- Shandera, W.X., C.O. Tacket and P.A. Blake. 1983. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J. Infec. Dis.* 147: 167.
- Silveira, E.R. and J.D. Mcchesney. 1994. 6,7-oxygenated neo-clerodane furan diterpenes from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry*. 36: 1457 - 1463.
- Skjelkvale, R. and T. Uemura. 1977. Experimental diarrhoea in human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 281.

Smith, L.D. and B.L. Williams. 1984. *The pathogenic anaerobic bacteria*, 3rd. ed. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill.

Smyth, C.J. and J.P. Arbuthnott. 1974. Properties of *Clostridium perfringens* (*welchii*) type A alpha-toxin (phospholipase C) purified by electrofocusing. *J. Med. Microbiol.* 7: 41 - 66.

Solórzano, S.F., B.M. Leños and H.C. Guiscafré. 1987. Resistencia antimicrobiana actual de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella spp.* *Boletín médico del Hospital Infantil de México.* 44: 448-455.

Sporston, T., J.E. Little and M.W. Foote. 1948. Antibacterial and antifungal substances from Vermont plants. *Vermont Agric. Exp. Sta. Bull.* 543: 3

Sterne, M. and G.H. Warrac. 1964. The types of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol Bacteriol.* 88: 279 - 283.

Sugahara, T., T. Tkahashi, S. Yamaya and A. Ohsaka, 1977. Vascular permeability increase by α -toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Toxicom* 15: 81 - 87.

- Swartz, M.N. 1985. Bacilos esporulados anaerobios: *Clostridium*, p. 579 - 588. In Davis, B.D. Dulbecco, R., H.N. Eisen and Ginsberg, H.S. (Ed.) Tratado de microbiología. Tercera Edición. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España.
- Toda, M., S. Okubo, R. Hiyoshi and R. Tadakatsu. 1988. The bactericidal activity of tea and coffee. Lett. Appl. Microbi. 8: 123 - 125.
- Todd, E.C.D. 1978. Foodborne disease in six countries- A comparison. J. Food Protect. 41: 559 .
- Todd, E.C.D. 1983. Foodborne disease in Canada: A five years summary. J. Food Protect. 46: 650
- Todd, E.C.D. 1990. Foodborne illness: Epidemiology of foodborne illness; North America. The Lancet 336: 788 - 790
- Tranter, H.S., C.S. Tassou and G.J. Nychas. 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbi. 74: 253 - 259.

- Vazquez-Ronceno, A., R. Maestro-Duran and E. Graciani-Constante. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna . II Polifenoles del alpechin. *Grasas y Aceites* 25: 341 - 345.
- Willardsen, R.R., F.F. Busta, C.E. Allen and L.B. Smith. 1978. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. *J. Food Sci.* 43:470.
- Willis, A. T. 1960. Anaerobic bacteriology in clinical medicine. Butterworth and Co. (Publishers) Ltd. London.
- Wnek, A. and B.A. McClane. 1989. Preliminary evidence that *Clostridium perfringens* type A enterotoxin is present in 160,000-Mr complex in mamalian membranes. *Infect. Immun.* 57: 574- 581
- Yashphe, J., R. Segal, A. Breuer and G. Erdreich-Naftali. 1979. Antibacterial activity of *Artemisia herba-alba*. *J. Pham. Sci.* 68: 924
- Yotis, W.W. and C. Castinpolas. 1975. Scanning isoelectric focusing and isotachoforesis of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 147 - 154.

Zaika, L.L. 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*. 9: 97

