UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO ZOOTECNISTA

EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO (*Allium sativum*) EN EL CONTROL DE LOS TRES PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS DE LA MASTITIS BOVINA.

Autor: Bach. Wuilder Pablo Chumbe Valqui

Asesor: M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reátegui Inga

Registro (…..)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO ZOOTECNISTA

EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO (*Allium sativum*) EN EL CONTROL DE LOS TRES PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS DE LA MASTITIS BOVINA.

Autor: Bach. Wuilder Pablo Chumbe Valqui

Asesor: M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reátegui Inga

Registro (…..)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mis padres, Pablo Chumbe Vargas y Juana Valqui Ventura, por su inmenso apoyo moral y económico y ser los promotores para lograr el sueño más anhelado de ser profesional. A mis hermanos y amigos por su gran apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme vida y salud. Para lograr mí objetivo. Brindar mi más sincero agradecimiento, reconocimiento y cariño a mis padres Pablo y Juana, por todo el esfuerzo, sacrificio y paciencia que me brindaron durante todos estos años de mi formación académica, por darme el apoyo y las fuerzas necesarias para culminar mi proceso de formación profesional.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), por acogerme en sus aulas, a los profesores de la FIZAB por compartirme su conocimiento para lograr mi formación profesional.

Al laboratorio de PROSAN de la UNTRM, por facilitarme el uso de su ambiente y sus equipos y materiales para realizar el trabajo de ejecución correspondientes a la investigación a desarrollar.

A mi asesor M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reátegui Inga, agradecerle por su paciencia, dedicación, motivación, apoyo en la elaboración, así como también su ejecución.

También agradezco a mis amigos por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Ley de creación N° 27347

Dr. Policarpio Chauca Valqui

RECTOR

Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dra. Flor Teresa García Huamán

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama

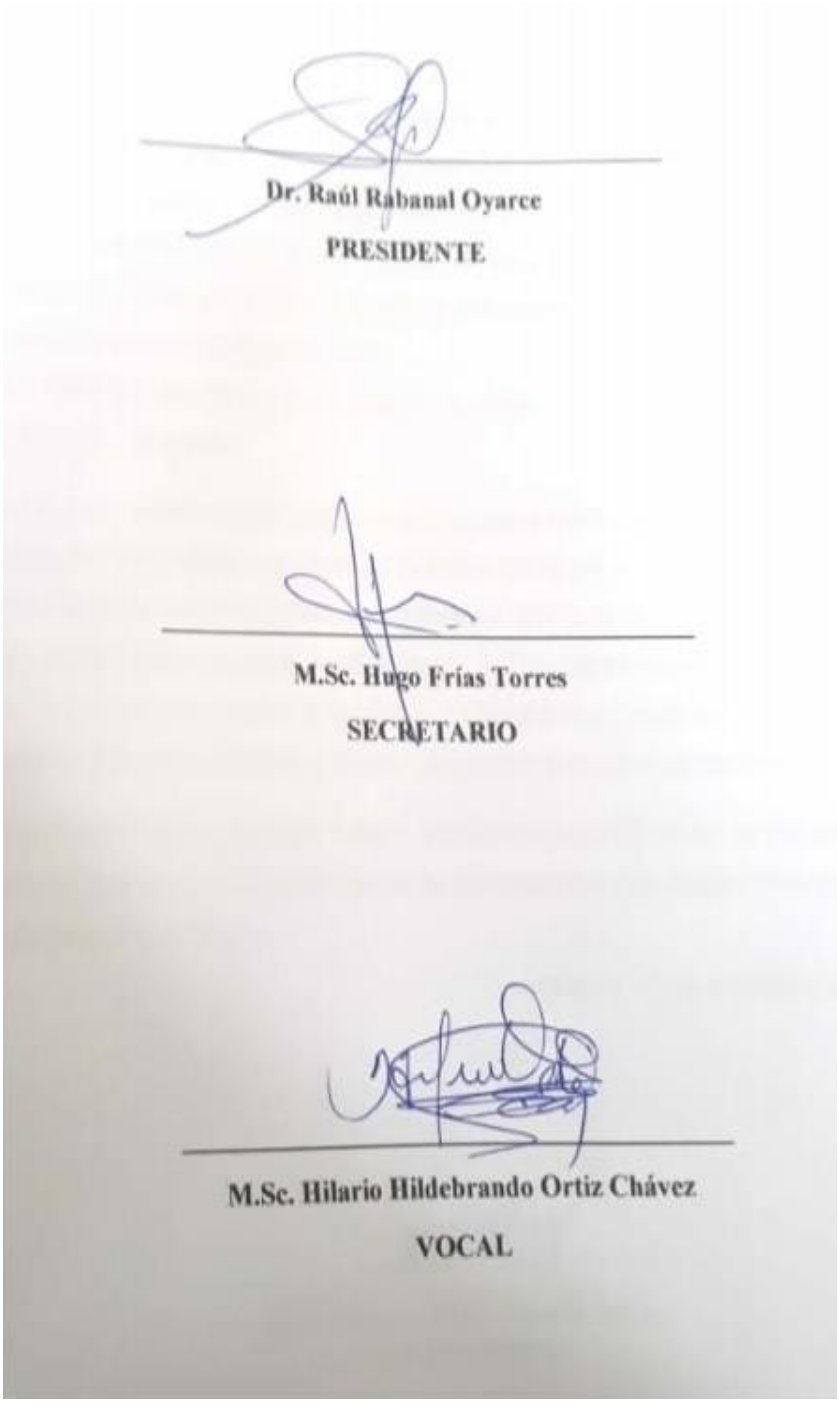
DECANO (e) DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA

VISTO BUENO DEL ASESOR

Yo, M.Sc. Reiner Pedro Gabriel Reátegui Inga, docente a tiempo completo de la carrera profesional de Ingeniería Zootecnista, hace constar que he asesorado el proyecto de tesis titulado **"EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO (*Allium sativum*) EN EL CONTROL DE LOS TRES PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS DE LA MASTITIS BOVINA "** presentado por el bachiller Wuilder Pablo Chumbe Valqui, egresado de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la UNTRM, dando el visto bueno a la presente tesis.

Se expide la presente, a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

JURADO EVALUADOR



Dr. Raúl Rabanal Oyarce

PRESIDENTE

M.Sc. Hugo Frías Torres

SECRETARIO

M.Sc. Hilario Hildebrando Ortiz Chávez

VOCAL

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

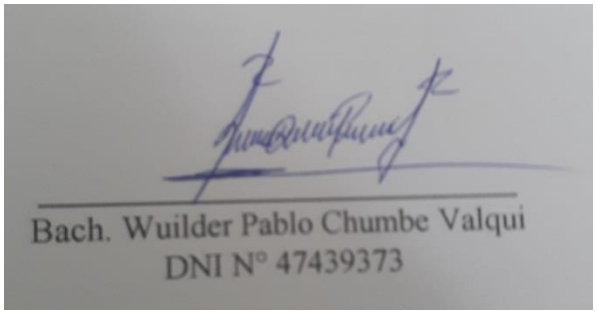
Yo, Wuilder Pablo Chumbe Valqui, identificado con DNI N° 47439373, estudiante de la escuela profesional de Ingeniería Zootecnista de la facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada: **"Efecto del extracto de ajo (*Allium sativum*) en el control de los tres principales agentes infecciosos de la mastitis bovina"**
2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificadas, ni duplicados, ni copiados

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda la responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piraterías, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 15 de noviembre del 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

ANEXO 3-N

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 07 de FEBRERO del año 2020, siendo las 4:30 p.m. horas, el aspirante Wuilder Pablo Chumbe Valqui defiende en sesión pública la Tesis titulada: "EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO (Allium Sativum) EN EL CONTROL DE LOS TRES PRINCIPALES AGENTES INFECCIOSOS DE LA MASTITIS BOVINA".

para obtener el Título Profesional de INGENIERO ZOOTECNISTA

a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente : Dr. RAÚL RABANAL OYARCE

Secretario : M.Sc. Hugo Frias Torres

Vocal : M.Sc. Hilario Hildebrando Ortiz Chávez

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (X) Desaprobado ( )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 5:30 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

VOCAL

PRESIDENTE

OBSERVACIONES: .....

ÍNDICE GENERAL

Pág.

DEDICATORIA……. iii

AGRADECIMIENTO…… iv

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS……. v

VISTO BUENO DEL ASESOR …… vi

JURADO EVALUADOR …….. vii

DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO …… viii

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS …….. ix

ÍNDICE GENERAL……..…. x

ÍNDICE DE TABLAS……... xii

ÍNDICE DE FIGURAS ……. xiii

Resumen…… xiv

Abstract……. xv

I. INTRODUCCIÓN ……..……... 16

II. MATERIALES Y MÉTODOS ….…….……... 18

2.1. Lugar de ejecución del trabajo .....…….. 18

2.2. Alcance de la investigación ……..…… 18

2.3. Variables de estudio ….…….…….…… 18

2.3.1. Variables independientes ….…… 18

2.3.2. Variables dependientes ….…… 18

2.4. Modelo de esquema de registro de datos ……..…… 18

2.5. Métodos…….……..... 19

2.5.1. Obtención del extracto de ajo …….…… 19

2.5.2. Cepas bacterianas ….…….…….…… 19

2.6. Métodos microbiológicos …...…….……...…….. 19

2.6.1. Preparación de medios de cultivo e identificación de bacterias ……... 19

2.6.2. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de ajo …….. 21

2.7. Análisis de datos ……..… 21

III. RESULTADOS ……...…… 23

3.1. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Escherichia coli* ……. 23

3.2. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Staphylococcus aureus* .. 23
3.3. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Streptococcus agalactiae* ……...…… 24
IV. DISCUSIÓN ..……. 26
V. CONCLUSIONES ……. 28
VI. RECOMENDACIONES ……. 29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……... 30
ANEXOS……...…….……. 33

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Esquema de registro de datos del experimento …..…… 18
Tabla 2. Diámetros de halos en *Escherichia coli* con diferentes concentraciones de extractos de ajo ……..…… 23
Tabla 3. Diámetro de halos en *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de extracto de ajo ……. 23
Tabla 4. Diámetro de halos en S*treptococcus agalactiae* con diferentes concentraciones de extracto de ajo ……..…… 24
Tabla 5. Tabla de identificación bioquímica para TSI ……...….. 35
Tabla 6. Tabla de identificación bioquímica para LIA ……. 35
Tabla 7. Tabla de interpretación para Citrato de Simmons …….. 36
Tabla 8. Tabla de interpretación para la técnica de Indol……. 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 01. Formación del halo en la placa Petri ……..…….. 21
Figura 02. Muestra de leche de vaca con mastitis clínica ……... 38
Figura 03. Agares usados en la investigación para sembrar bacterias……... 38
Figura 04. Preparación y auto clavado de los agares ……. 39
Figura 05. Llenado de las placas Petri con los agares …… 39
Figura 06. Agares para la identificación de las bacterias causantes de las mastitis… 40
Figura 07. Centrifugado de muestra de leche para sembrar en las placas Petri…….. 40
Figura 08. Sembrado e incubación de las bacterias de la mastitis clínica…….. 41
Figura 09**.** Resultados de la identificación de *Escherichia coli* (izquierda) y *Streptococcus agalactiae* (derecha) después de 24 horas de incubación 41
Figura 10. Obtención del extracto de ajo …… 42
Figura 11. Preparación de los tratamientos……. 42
Figura 12. Remojado de los discos de sensibilidad en los tratamientos……. 43
Figura 13. Colocación de los discos de sensibilidad en las placas Petri para la Evaluación del efecto antibacteriano…… 43
Figura 14. Incubación de las placas Petri para medir el efecto antibacteriano de extracto de ajo ……..... 44
Figura 15. Resultado final del efecto antibacteriano (diámetro del halo) en *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* …….…… 44
Figura 16. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a la *Escherichia coli* ….. 45
Figura 17. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente al *Estaphyloccocus aureus* …….…….…… 45
Figura 18. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente al *Streptococcus agalactiae* …… 46

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano del extracto de ajo (*Allium sativum)* en el control de los tres principales agentes de la mastitis bovina, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. Las concentraciones usadas fueron 0%, 20%, 40% y 60% de extracto de ajo (EA) en agua destilada. Se empezó obteniendo y centrifugando la muestra de leche con signos de mastitis, posteriormente se eliminó el sobrenadante de la muestra, para obtener el concentrado de bacterias para luego realizar la siembra en los medios de cultivo: Mac Konkey, Manitol Salado y Agar Sangre; luego se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente se sembró para el diferencial de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* y S*treptococcus agalactiae,* luego se utilizó una suspensión bacteriana para las 3 bacterias para luego sembrar en agar Muller-Hinton, finalmente se colocó los discos de sensibilidad (según tratamientos) en las placas Petri con agar Muller-Hinton dejándolo en incubación a 37°C por 24 horas. Se evaluó el efecto antibacteriano siendo más eficiente para *Escherichia coli* y S*treptococcus agalactiae* la concentración de 60%, mientras que para el *Staphylococcus aureus* fue de 40%.

El efecto antibacteriano del ajo puede deberse a sus compuestos químicos con propiedades bactericidas, siendo los principales la alixina, alicina, aliina, tiosulfinatos, tiosulfonatos y sulfuros.

Se concluye que el EA con las concentraciones de 40 y 60% demostraron ser efectivos en el control *in vitro* frente a los precursores de la mastitis bovina.

PALABRAS CLAVES: Efecto antibacteriano, extracto de ajo, diámetro de halo, mastitis bovina

Abstract

In the present study the antibacterial effect of garlic extract (*Allium sativum*) in the control of the three main agents of bovine mastitis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* was evaluated. The concentrations used were 0%, 20%, 40% and 60% garlic extract (EA) in distilled water. It was started by obtaining and centrifuging the milk sample with signs of mastitis, then the supernatant was removed from the sample, to obtain the bacteria concentrate and then sowing in the culture media: Mac Konkey, Salted Mannitol and Blood Agar; then we leave in incubation in a period of 24 hours at 37 ° C. Subsequently, it was seeded for the differential of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y S*treptococcus agalactiae*, then a bacterial suspension was used for the 3 bacteria and then seeded on Muller-Hinton agar, finally the sensitivity discs (according to treatments) were placed in the Petri dishes with Muller-Hinton agar leaving it in incubation at 37 ° C for 24 hours. The antibacterial effect was evaluated being more efficient for *Escherichia coli* and *Estreptococcus agalactiae* the concentration of 60%, while for *Staphylococcus aureus* it was 40%.

The antibacterial effect of garlic may be due to its chemical compounds with bactericidal properties, the main ones being alixin, allicin, alliin, thiosulphinates, thiosulfonates and sulfides.

It is concluded that the EA with the concentrations of 40 and 60% proved effective in the in vitro control against the precursors of bovine mastitis.

KEY WORDS: Antibacterial effect, garlic extract, halo diameter, bovine mastitis

I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche está integrado a la economía global ya que existen actualmente grandes exportaciones e importaciones y esto a su vez está en aumento, creando este ambiente amenazas y oportunidades para la competitividad de la producción lechera peruana (Gamarra, 2001).

Por lo antes mencionado la producción y actividad lechera está destinado a aumentar con el transcurrir del tiempo. La mastitis es la principal enfermedad en la producción lechera por lo que representa pérdidas económicas en grandes centros de producción. Como se sabe, la mastitis es producida en general por tres principales bacterias que son: *Eschericha coli*, *Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus*; los cuales son los causantes de la mastitis bovina, estas bacterias provocan la inflamación de la glándula mamaria, es la enfermedad más común y costosa del ganado lechero en la mayor parte del mundo.

Al mismo tiempo las enfermedades de los animales pueden incrementar la morbilidad y mortalidad del rebaño lechero o si no disminuir la productividad de leche; en casi todo el mundo esto provoca pérdidas económicas. Se puede decir que las enfermedades pueden reducir o afectar la productividad al disminuir el rendimiento lechero, reducir la fertilidad en algunos casos, retrasa la llegada de la pubertad en algunos animales, puede afectar la calidad de la leche y reducir el nivel de conversión de los alimentos (FAO, 2019).

Se puede decir que la medicina tradicional está basada en las plantas naturales, originalmente los únicos elementos curativos que conocía el hombre se ha mantenido a través de la historia y sobre todo esto se da en zonas rurales remotas o entre minorías étnicas de la sociedad moderna, donde la medicina moderna actualmente aún sigue siendo desconocida en donde las plantas aun proporcionan las únicas medicinas (Portilla 2002); por el bajo costo y efectividad que representa las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades, se ve como una alternativa para su uso en la actividad pecuaria.

En este caso el ajo (*Allium sativum*) contiene alicina esto ha sido utilizado por diversas civilizaciones en la elaboración y en múltiples preparaciones medicinales antifúngica, del ajo se remonta al siglo pasado (Ledezma & Apitz, 2006; Torija, Matallana, & Chalup, 2013), Timonin y Thexton (1951) y Tansey (1975), citado por Juárez, et al. (2019)

observaron que extractos acuosos del ajo pueden inhibir el crecimiento de diversas especies de hongos y bacterias. Los extractos de plantas del género *Allium sativum*, entre estos el ajo y la cebolla, forman de un importante grupo dentro de los ingredientes con posibles propiedades farmacológicas y/o terapéuticas debido a la composición química, entre estos los principios activos que posee: organosulfurados, como tiosulfinatos, tiosulfonatos y sulfuros, con capacidad para modificar la fisiología de los animales, desarrollando un efecto antimicrobiano en la prevención y tratamiento de distintas enfermedades (Ariza, 2015).

Se han realizado varias investigaciones con el ajo para el tratamiento para diversas enfermedades mas no investigaciones para el control *in vitro* de los agentes patológicos de la mastitis bovina. En la actualidad se conocen más de 100 compuestos biológicamente activos derivados de *Allium sativum* contenidos sobre todo en el bulbo. Destaca una sustancia sulfurada inodora llamada aliína que por acción de aliinasa se convierte en esencia de ajo y levulosa.

Por lo antes mencionado se plantea la siguiente hipótesis; el extracto de ajo contiene la alicina y otros principios activos, los cuales tendrán efectos antibacterianos *in vitro*, contra *Eschericha coli, Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto de ajo sobre el desarrollo *in vitro* de *Escherichia coli, Sthaphyloccocus Aureus y Streptoccocus Agalactiae*.

En este contexto, la presente investigación busca generar una alternativa sanitaria para la producción de leche en bovinos a nivel familiar ya que el uso de medicamentos naturales para el tratamiento de la mastitis está al alcance del productor a un bajo costo, representando esto a una mayor rentabilidad sin perder la efectividad en el tratamiento de la mastitis bovina y siendo menos tóxicos (Stauffer, Orrego y Aquino, 2000).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución del trabajo.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos (Facultad de Ingenieria Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología) y en el Laboratorio de Microbiología (Facultad de Ingeniería Ciencias Agrarias), ambos laboratorios pertenecientes a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), que se encuentra ubicada en la Región de Amazonas, Provincia de Chachapoyas, Distrito Chachapoyas con altitud de 2483 m.s.n.m a 6°13´00´´de latitud sur y latitud oeste de 77°51´00´´.

2.2. Alcance de la investigación.

El alcance de la investigación es experimental.

2.3. Variables de estudio.

2.3.1. Variables independientes.

• Extracto de ajo (A*llium sativum*)

2.3.2. Variables dependientes

• **Control de agentes infecciosos.**

- Diámetro del halo (milímetros)

2.4. Modelo de esquema de registro de datos.

Tabla 1.
Esquema de registro de datos del experimento.

Repeticiones	Tratamientos			
	T0	T1	T2	T3
1				
2				
3				
4				
Total				

2.5. Métodos.

2.5.1. Obtención del extracto de ajo.

- Los ajos fueron obtenidos en el mercado local y luego ser pelados para pesar 500 g.
- Luego los ajos fueron pasados por una extractora de uso doméstico (Anexo 03, figura 13).

2.5.2. Preparación de los tratamientos.

- T_0 = 0% EA (0 ml de extracto + 25 ml de agua destilada).
- T_1 = 20% EA (5 ml de extracto + 20 ml de agua destilada).
- T_2 = 40% EA (10 ml de extracto+ 15 ml de agua destilada).
- T_3 = 60% EA (15 ml de extracto+ 10 ml de agua destilada).

2.5.2. Cepas bacterianas.

Las cepas que se utilizaron en el ensayo de la actividad antibacteriana van a ser adquiridas de la leche de vacas que presenten mastitis clínica (Anexo 03, figura 02).

2.6. Métodos microbiológicos.

2.6.1. Preparación de medios de cultivo e identificación de bacterias.

Para la preparación de los agares y medios de identificación bioquímica que se mencionarán, se siguió el procedimiento, que se encuentran en los prospectos, que recomienda los laboratorios fabricantes de estos insumos; los cuales fueron colocados en el anexo 1.

- *Escherichia coli:*

a. Cultivo de microrganismos.

Se empezó obteniendo y centrifugando la muestra de leche (Anexo 03, figura 07) con signos de mastitis (Anexo 03, figura 02), posteriormente se eliminó el sobrenadante de la muestra, para obtener el concentrado de bacterias para luego realizar la siembra en agar Mac Konkey (Anexo 01), luego dejamos en incubación en un periodo de 24 horas a 37°C (Anexo 03, figura 08).

b. Identificación de la bacteria.

Para la identificación se preparó una suspensión de colonias para la inoculación en los medios de identificación bioquímica (TSI, LIA, CITRATO, SIM) (Anexo 03, figura 06).

incubando los medios en estufa a 37 °C de 18 – 24 horas. La metodología de estos agares se explica en el anexo 2.

c. Aplicación de concentrado de extracto de ajo.

Se preparó los tratamientos en estudio en vasos de precipitado (Anexo 03, figura 11), se mezcló homogéneamente la disoluciones (extracto de ajo y agua destilada) para luego mojar los discos de sensibilidad (papel filtro) (Anexo 03, figura 12) de 6 mm de diámetro y finalmente colocarlos en las respectivas placas Petri (Anexo 03, figura 13). como se observa en la figura 01.

- ***Streptococcus agalactiae:***

a. Cultivo e identificación de microrganismos.

Se empezó obteniendo y centrifugando la muestra de leche (Anexo 03, figura 07) con signos de mastitis (Anexo 03, figura 02), posteriormente se eliminó el sobrenadante de la muestra, para obtener el concentrado de bacterias para luego realizar la siembra en Agar Sangre (Anexo 01), luego dejamos en incubación en un periodo de 24 horas a 37°C (Anexo 03, figura 08). Después de 24 horas se observó el crecimiento de colonias blancas. Esta bacteria crece como colonias beta-hemolíticas en agar sangre y puede ser identificado.

b. Aplicación de concentrado de extracto de ajo.

Se preparó los tratamientos en estudio en vasos de precipitado, se mezcló homogéneamente la disoluciones (extracto de ajo y agua destilada) para luego mojar los discos de sensibilidad (papel filtro) (Anexo 03, figura 12). de 6 mm de diámetro y finalmente colocarlos en las respectivas placas Petri (Anexo 03, figura 13), como se muestra en la figura 01, las cuales contenía el agar Muller-Hinton (Anexo 01).

- ***Staphyloccocus aureus:***

a. Cultivo e identificación de microrganismos.

Se empezó obteniendo y centrifugando la muestra de leche (Anexo 03, figura 07) con signos de mastitis (Anexo 03, figura 02), posteriormente se eliminó el sobrenadante de la muestra, para obtener el concentrado de bacterias para luego realizar la siembra en Agar Manitol Salado (Anexo 01), luego dejamos en incubación en un periodo de 24 horas a

37°C (Anexo 03, figura 08). Después de 24 horas se observó el crecimiento de colonias de color amarillas.

b. Aplicación de concentrado de extracto de ajo.

Se preparó los tratamientos en estudio en vasos de precipitado, se mezcló homogéneamente la disoluciones (extracto de ajo y agua destilada) para luego mojar los discos de sensibilidad (papel filtro) (Anexo 03, figura 12) de 6 mm de diámetro y finalmente colocarlos en las respectivas placas Petri (Anexo 03, figura 13), como se observa en la figura 01, las cuales contenía el agar Muller-Hinton (Anexo 01).

2.6.2. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto de ajo.

La evaluación del efecto antibacteriano consistió en medir el diámetro del halo en las placas Petri (Anexo 03, figura 15). Los halos son formados por el efecto farmacológico del extracto del ajo sobre las bacterias en estudio y por lo tanto en el área del halo no crecerán esas bacterias.

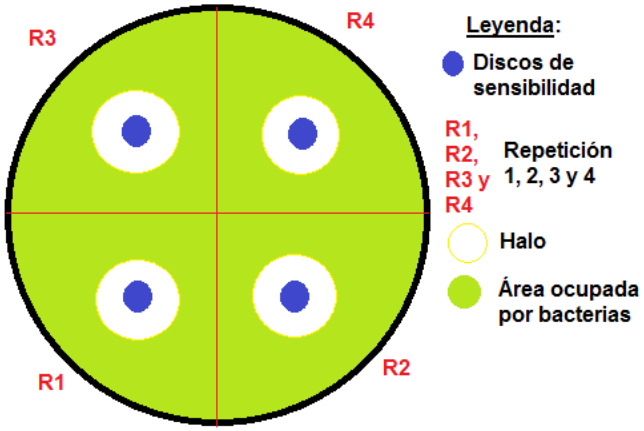


Figura 01. Formación del halo en la placa Petri.

2.7. Análisis de datos.

Para el análisis de datos se empleó el diseño completamente al azar (DCA). Donde se va a tener 3 tratamientos con 4 repeticiones por cada tratamiento.

Modelo aditivo lineal: Es un modelo aditivo lineal Tipo 1:

$Y_{ijk} = U + T_i + E_{ij}$; $i = 1, 2\ldots\ldots$ (Tratamientos) $j = 1, 2\ldots.$ (Repeticiones) donde:

Y_{ij} = Diámetro del halo.

U= Efecto de la media general.

T_i = efecto del i- ésimo tratamiento con inclusión de extracto de ajo.

E_{ij} = Efecto del j-ésimo unidad experimental a la que se aplica el i-ésimo tratamiento (efecto del error experimental)

Nivel de significancia (α): 5%

Nivel de confianza (1-α): 95%

- **Comparación de medias**

Para la comparación de medias se va a realizar la evaluación del modelo lineal tipo 1, un análisis de varianza (ANVA), si los resultados fuesen significativos se analizarán con la prueba de Tukey; con un nivel de significancia del 0,05.

III. RESULTADOS

3.1. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Escherichia coli.*

En la tabla 2 y figura 16 del anexo 4, se observa los resultados de las repeticiones 1; 2; 3 y 4 (R1, R2, R3 y R4) y el promedio de cada tratamiento; de estos no existe diferencia estadística ($p < 0,05$) entre los tratamientos T_2, T_3 y T_4; mientras si existiendo con el T_1 frente a los antes mencionados. Observándose también que el diámetro del halo formado en cultivos de *Escherichia coli*, crece numéricamente de acuerdo va aumentando la concentración del extracto del ajo.

Tabla 2.

Diámetros de halos en *Escherichia coli* con diferentes concentraciones de extractos de ajo.

Extracto de Ajo	Diámetro del halo (mm)				Promedio[1]
	R1[2]	R2[3]	R3[4]	R4[5]	
T_1 (0%)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 A
T_2 (20%)	17,500	17,000	17,500	17,000	17,250 ± 0,289 B
T_3 (40%)	24,500	21,500	16,500	17,500	20,000 ± 3,697 B
T_4 (60%)	22,000	23,000	19,000	16,500	20,125 ± 2.955 B

[1]Letras diferentes dentro de la columna indica diferencia estadística ($p < 0,05$)
[2; 3; 4 y 5]Repetición 1; 2; 3 y 4.

3.2. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Staphyloccocus aureus*.

En la tabla 3 y figura 17 del anexo 4, se observa los resultados de las repeticiones 1; 2; 3 y 4 (R1, R2, R3 y R4) y el promedio de cada tratamiento; se puede decir que no existe diferencia estadística ($p <0,05$) entre los diámetros de halo de T_1 y T_2 mientras si a estos lo comparamos con el T_3 y T_4 se puede deducir que son estadísticamente diferentes ($p <0,05$). El diámetro del halo fue numéricamente mayor en el T_3 con 23,25 mm.

Tabla 3.

Diámetro de halos en *Staphyloccocus aureus* con diferentes concentraciones de extracto de ajo.

Extracto de Ajo	Diámetro del halo (mm)				Promedio[1]
	R1[2]	R2[3]	R3[4]	R4[5]	
T_1 (0%)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 A
T_2 (20%)	9,000	1,500	0,000	0,000	2,625 ± 4,308 A
T_3 (40%)	23,000	21,000	25,500	23,500	23,250 ± 1,848 B
T_4 (60%)	19,500	18,500	20,000	16,000	18,500 ± 1,780 B

[1]Letras diferentes dentro de la columna indica diferencia estadística ($p < 0,05$)
[2; 3; 4 y 5]Repetición 1; 2; 3 y 4.

3.3. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a *Streptococcus agalactiae.*

En la tabla 4 y figura 18 del anexo 4, se observa los resultados de las repeticiones 1; 2; 3 y 4 (R1, R2, R3 y R4) y el promedio de cada tratamiento; no existiendo diferencia estadística ($p < 0,05$) entre los tratamientos T_2, T_3 y T_4; mientras que con el T_1 si existe frente a los otros tratamientos. Observándose también que el diámetro del halo formado en cultivos de *Streptococcus agalactiae*, crece numéricamente de acuerdo va aumentando la concentración del extracto del ajo.

Tabla 4.

Diámetro de halos en *Streptococcus agalactiae* con diferentes concentraciones de extracto de ajo.

Extracto de Ajo	Diámetro del halo (mm)				Promedio
	R1[2]	R2[3]	R3[4]	R4[5]	
T_1 (0%)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 A
T_2 (20%)	16,000	14,500	16,500	16,500	15,875 ± 0,946 B
T_3 (40%)	20,500	23,000	16,500	10,500	17,625 ± 5,452B
T_4 (60%)	23,500	15,000	20,500	15,000	18,500 ± 4,223 B

[1]letras diferentes dentro de la columna indica diferencia estadística ($p < 0,05$)

[2; 3; 4 y 5]Repetición 1; 2; 3 y 4.

IV. DISCUSIÓN

En la tabla 2 se observa un efecto antibacteriano del extracto de ajo esto debido a que el tamaño del diámetro del halo va creciendo dimensionalmente de acuerdo va aumentando la concentración del extracto de ajo de 20%, 40% y 60% (T_2, T_3 y T_4; respectivamente), sin existir diferencia estadística entre estos tratamientos. El mencionado efecto puede deberse a que el ajo posee compuestos azufrados (principios activos) como la alixina, alicina, aliina, ajo en, adenosina, alil metano tiosulfinato, dialil disulfuro, dialil trisulfuro, alil metil triosulfinato, S-alil mercaptocisteína, 2-vinil-4H-1,2-ditiina y 5-alilcisteína (Olmedo, 2010 y Luengo, 2007); entre estos compuestos, la alicina ha demostrado que posee actividad antibacteriana frente a la *Escherichia coli* (Ledezma y Apitz, 1998).

La actividad antimicrobiana según Ghannoum, et al. (2004) se puede explicar a la presencia de la alicina o componentes derivados de esta ya que estos disminuyen la respiración de los microorganismos, reduciendo así el crecimiento del organismo e inhibiendo la síntesis de algunos componentes químicos (principalmente proteínas, ácidos nucleicos y lípidos), los cuales causan daños a las membranas, indicando también que un ajo sin estos químicos no mostró actividad antimicrobiana *in vitro*. Si comparamos el efecto antibacteriano del extracto de ajo con antibióticos sintéticos o comerciales como la cefixima, cefuroxima y nitrofurorantoina los cuales tienen un alto afecto bacteriano frente a la *Escherichia coli* (Sánchez, et al., 2003), los tamaños mínimos y máximos de halos que tuvieron los mencionados antibióticos, según MINSA (2002) fueron 23 a 27 mm (5 mg de cefixima); 20 a 26 mm (30 mg de cefuroxima) y 20 a 25 mm (300 mg de nitrofurantoina), respectivamente; para el caso de esta investigación se obtuvo un diámetro de halo en promedio de 20,125 mm (T_4), comparándose su efecto con la cefuroxima y nitrofurorantoina.

Por su parte López, Sánchez, Batlle & Nerin (2005) clasifica la susceptibilidad del microorganismo frente a un medicamento de acuerdo al tamaño del halo en milímetros siendo esta la siguiente: se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es mayor a 30-35 mm, intermedios cuando el diámetro de la zona varía entre 20 y 30 mm, o resistentes con una zona cuyo diámetro es menor a 15-20 mm; teniendo la *Escherichia coli* una susceptibilidad intermedia frente al extracto de ajo con 40% (20 mm) y 60% (20,125 mm) de concentración.

En la tabla 3 se observa que el T_3 y T_4 obtuvieron los diámetros de halos más grandes; 23,25 y 18,5 mm, respectivamente; estadísticamente iguales ($p < 0,05$) entre ellos y

diferentes a T_1 y T_2; el efecto antibacteriano frente al *Estreptococuss agalactiae* que se observa más pronunciado en los T_3 y T_4 puede deberse a los aceites esenciales presentes en el extracto de ajo, los mencionados componentes los podemos encontrar en la material vegetal como hierbas, flores, hojas, semillas, ramas, y cortezas, entre otros (Burt, 2004); Años recientes, los aceites esenciales (AE) están siendo usados como agentes antibacterianos (Sacchetti et al., 2005), concordando con Kalemba & Kunicka (2003) quienes indican que los efectos antibacterianos se deben principalmente a los compuestos químicos presentes en los AE; ante esto Reyes, Palou y López, (2014) indican que en los aceites esenciales existen varios compuestos químicos con actividad antimicrobiana por lo tanto el efecto bactericida del extracto de ajo no puede ser atribuido a uno en específico si no a la acción combinada a más de uno las cuales actuarán sobre distintas partes de la célula microbiana. El modo de acción de los AE, según Holley & Patel (2005) y Fisher & Phillips (2008) es que estos ingresan al citoplasma de la bacteria, donde desnaturalizan las proteínas destruyendo la membrana celular, haciéndola más permeable, por lo que esta se rompe y genera la fuga del material del citoplasma, produciendo así la muerta de la bacteria. Por su parte Takefumi et al. (2006), citado por Katsuki, et al. (2006) demostraron que el S-alil cisteína, uno de los componentes del extracto de ajo, tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de células cancerígenas, mediante la inhibición de la mitosis de estas células.

Los AE del ajo está compuestos por sustancias azufradas (organosulfurados) (Martínez, 2003), siendo estos compuestos tiosulfinatos, tiosulfonatos y sulfuros (Ariza, 2015). Tajkarimi et al. (2010) afirman que las bacterias gram positivas en la mayoría de los casos son más sensibles a los efectos de los aceites esenciales que a las bacterias gram negativas ya que estas poseen en su membrana externa lipopolisacáridos los cuales restringen la difusión de compuestos hidrófobos.

MINSA (2002) menciona que el diámetro del halo (untado con antibióticos sintéticos) de los el disco de sensibilidad para que el efecto sea catalogado como sensible para que contiene oxalicina (1 μg) y trimetoprim/sulfametoxazol (1,25 y 23,75 μg, respectivamente) es de 13 y 16 mm, respectivamente, probados en *Staphylococcus spp*., si los comparamos con los datos obtenidos en la presente investigación, el T_3 y T_4 (23,25 y 18,5 mm, respectivamente) ambos superando a la oxalicina y a trimetoprim/sulfametoxazol.

En la tabla 4, se observa que los T_2, T_3 y T_4 con 20; 40; y 60% de extracto de ajo respectivamente; no demostraron diferencia estadística, mas si diferencia numérica, y según esto se puede interpretar que a mayor concentración de extracto de ajo existirá mayor diámetro de halo; este efecto puede deberse gracias a que el ajo usado en esta evaluación pasó por un proceso de extractado esto a que, según Timonin y Thexton, 1951 y Tansey, 1975; citado por Juárez, et al. (2019) el ajo posee un químico llamado aliína que por acción de la enzima aliinasa se convierte en esencia del ajo y levulosa; la esencia del ajo contiene la alicina, la cual demuestra efectos antimicrobiológicos *in vitro* (bactericida y fungicida principalmente); indicando casi parecido Ried, Frank, Stocks, & Fakler (2008) y Lawson & Gardner (2005) mencionan que el componente "madre" y el más importante de sus propiedades terapeúticas es la aliína (sulfóxido de Salil- cisteína), la cual se encuentra inactivado, que gracias a la aliinasa, la convierte en alicina dándose esta transformación cuando se corta o muele el ajo, de la alicina se sintetizan otros compuestos activos farmacológicamente como disulfuro de alilo (olor de ajo), ajoeno, (un disulfuro insaturado, formado por la unión de tres moléculas de alicina) y la quercetina (flavonoide también antioxidante). En otra investigación se demostró que la alicina es un antimicrobiano, esto se debe a que la mencionado químico reacciona químicamente con los grupos tiol de las diferentes enzimas; como por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa, la tiorredoxina reductasa y el ARN polimerasa, que pueden afectar el metabolismo esencial de la actividad proteinasa de la cisteína, implicada en la virulencia de los microrganismos (Calixto, 2006; citado por Ramírez, Castro y Martínez, 2016). Por su parte Alkahil (2005), citado por Juárez, et al. (2019) demostró que el extracto acuoso de ajo obtuvo un 95% de actividad fungicida, atribuyendo este efecto a que el extracto de ajo disminuye la respiración, reducen el crecimiento, dañan las membranas e inhiben la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ankri & Mirelman, 1999; Bender & Bárcenas, 2013; Pundir & Jain, 2010). Acotando González, Guerra, Maza y Cruz (2014) indican que no solo la alicina tiene efectos bactericidas contra bacterias gram positivas y gram negativas, también contribuyen los ajoenos y el trisulfuro de dialilo.

MINSA (2002) menciona que el diámetro del halo (untado con antibióticos sintéticos) de los el disco de sensibilidad para que el efecto sea catalogado como sensible para que contiene ampicilina y penicilina (10 μg) y vancomicina (30 μg) es de 24 y 17 mm, respectivamente, probados en *Streptococcus spp*., si los comparamos con los datos obtenidos, el T_3 y T_4 (17,625 y 18,5 mm, respectivamente) solo supera a la vancomicina.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto de ajo de 20; 40 y 60% demostraron ser considerablemente efectivos frente a la *Escherichia coli* con 17,25; 20 y 20,125 mm de diámetro de halo respectivamente.

2. El extracto de ajo de 40 y 60% demostraron ser considerablemente efectivos frente a la *Staphyloccocus aureus* con 23,25 y 18,5 mm de diámetro de halo respectivamente.

3. El extracto de ajo de 40 y 60% demostraron ser considerablemente efectivos frente a la *Streptococcus agalactiae* con 17,25; 20 y 20,125 mm de diámetro de halo respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones referentes al uso del ajo en el tratamiento de la mastitis bovina con diluciones.
- Realizar investigaciones sobre las propiedades farmacológicas de otras plantas medicinales oriundas de Amazonas.
- Acondicionar el laboratorio de la PROSAN para futuras investigaciones microbiológicas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic. Microbes and Infection, 2, 125–129.

Ariza, J. (2015). Evaluación de compuestos organosulfurados de aliáceas en la mejora sanitaria y productiva de las gallinas. SECCIONESAVICOLAS. Recuperado de https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/12/Evaluacion-de-compuestos-organosulfurados-de-aliaceas-en-la-mejora-sanitaria-y-productiva-de-las-gallinas

Bender, D., & Bárcenas, M. E. (2013). El ajo y sus Aplicaciones en la Conservación de Alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7, 25–36.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 223–253.

Córdova, M. de los Á. (2010). Extracción y Purificación de Alicina a partir de Ajo (Allium sativum L): Implicaciones Analíticas. Instituto Politécnico Nacional.

FAO. (2019). Sanidad Animal. FAO. Recuperado de http://www.fao.org/dairy-production-products/production/animal-health/es/

Fisher, K. & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science & Technology, 19(3), 156–164.

Gamarra, R. (2001). Situación actual y perspectivas de la ganadería lechera en la cuenca de Lima. SCIELO. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172001000200002

Ghannoum, M.A., Hossain, M.A., Long, L., Mohamed, S., Reyes, G., Mukherjee, P.K. (2004). Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of Trichophyton mentagrophytes-dermatophytosis. J Chemother. 2004; 16(2): 139-44.

González, M., Guerra, G., Maza, C. y Cruz, A. (2014). Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. MEDIGRAPHIC. Recuperado de, https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53884

Holley, R. & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, 22(4), 273–292.

Juárez, K.G., Díaz, E. J., Méndez, M. D., Pina, M. S. Pérez, A. D. y Sánchez, M. A. (2019). Efecto de extractos crudos de ajo (Allium sativum) sobre el desarrollo in

vitro de Aspergillus parasiticus y Aspergillus niger. http://dx.doi.org/10.18387/polibotanica.47.8

Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003) Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, 10, 813-829. http://dx.doi.org/10.2174/0929867033457719

Katsuki, T., Hirata, K., Ishikawa, H., Matsuura, N., Sumi, S. & Itoh, H. (2006). Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. J Nutr. 2006; 136(3 Suppl): 847S-851S.

Lawson, L.D. & Gardner, C.D. (2005). Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial. J Agric Food Chem 2005, 53(16):6254-61.

Ledezma, E., & Apitz, R. (2006). Ajoene, el Principal Compuesto Activo Derivado del Ajo (*Allium sativum*), un Nuevo Agente Antifúngico. *Revista Iberoamericana de Micología*, *23*, 75-80.

Ledezma, E. y Apitz, R. (1998). Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo del ajoene. Interciencia. 1998; 23(4): 227-31.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R. & Nerín, C. (2005). Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(17), 6939-6946.

Luengo, L.T. (2017). El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas, ámbito farmacéutico. Rev. fitoter. 2007; 26(1): 1-4.

Martínez, M. (2003). "Aceites Esenciales". Medellín: s.n., 2003.

MINAGRI. (2017). Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria y Avícola 2017. MINAGRI. Recuperado de http://siea.minagri.gob.pe/siea/sites/default/files/anuario-produccion-pecuaria-2017-261118_0.pdf

MINSA. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. Recuperado en 27 de diciembre de 2019, de http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf

Olmedo, P. (2010). Estudio de diferentes fracciones y extractos de Allium sativum sobre la reactividad vascular, niveles de colesterol y cultivos celulares. Revista Eureka. 2010; 1(1): 08-14.

Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). Antimicrobial Activity of Allium sativum Ethanolic Extract against Food Associated Bacteria and Fungi. Drug Invention Today, 2(4), 229–232.

Portilla, A. (2002). Amenazas a la diversidad biológica. En: El medio ambiente en el Perú. Lima, Perú: DESA S.A.

Ramírez, H. R., Castro, L. N. y Martínez, E. (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (Allium Sativum). UNSIS. Recuperado de, http://www.unsis.edu.mx/revista/doc/vol3num8/A4_Efectos_Terapeuticos_Ajo.pdf

Reyes, Palou y López. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. TSIA. Recuperado de, https://tsia.udlap.mx/metodos-de-evaluacion-de-la-actividad-antimicrobiana-y-de-determinacion-de-los-componentes-quimicos-de-los-aceites-esenciales/

Ried, K., Frank, O. R., Stocks, N. P. & Fakler, P. (2008). Effect of garlic on blood pressure: A systematic review and metaanalysis. BIOMEDCENTRAL. Recuperado de, http://www.biomedcentral.com/1471-2261/8/13.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. y Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, 91, 621-632.

Sánchez, J.M., Guillán, C., Fuster, C., Madrid, F.J., Jiménez, M., y García, J. (2003). Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. Actas Urológicas Españolas, 27(10), 783-787. Recuperado en 27 de diciembre de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062003001000003&lng=es&tlng=es.

Stauffer, A., Orrego, A. y Aquino, A. (2000). Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Rev. cienc. tecnol. 2000; 1(2): 29-33.

Tajkarimi, M., Ibrahim, S. & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9), 1199–1218.

Torija, E., Matallana, C., & Chalup, N. (2013). El Ajo y la Cebolla: de las Medicinas Antiguas al Interés Actual. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural Sección Biología, 107, 29-37

ANEXOS

Anexo 01. Descripción de los agares usados.

- **Agar MacConkey (*Escherichia coli*)**

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos (encontrados normalmente en el tracto intestinal) y diferenciarlos sobre la base de la fermentación de la lactosa. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias Gram negativos.

- Composición:

- Peptona
- Lactosa
- Cloruro de sodio
- Sales biliares
- Cristal violeta
- Rojo neutro

- Preparación:

Disolver 50 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C)

- **Agar Tripticase Soya (Agar Sangre) (*Estreptoccocus agalactiae*)**

El agar sangre es una combinación de un agar base con el agregado de 5 % de sangre ovina, también puede usarse sangre humana, para cultivos en una placa de Agar. El agar sangre aporta muchos factores de enriquecimiento. Se usa también para ver la capacidad hemolítica de los microorganismos patógenos

- Preparación:

Disolver 40 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C). luego agregar 5 – 8 % de sangre y servir en placas Petri.

- **Agar Manitol (*Staphyloccocus aureus*)**

Agar Manitol salado o siglas en inglés MSA (Mannitol salt agar) es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología. Permite el crecimiento de bacterias Gram-positivas mientras inhibe el crecimiento de Gram-negativas. Este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (~7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para Staphylococcus (y 'Micrococcaceae) debido su alta concentración de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias Gram negativas

El agar manitol salado es un medio selectivo usado para el aislamiento de estafilococos patógenos, especialmente *Staphylococcus aureus.*

- **Composición:**

- Digerido enzimático de caseína
- Digerido enzimático de tejido animal
- Extracto de carne de vaca
- D-manitol
- NaCl
- Rojo de fenol
- Agar

- **Preparación:**

Disolver 108 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C). Verter en placas Petri.

- **Agar Müller-Hinton (Antibiograma)**

El agar Müller-Hinton es un medio de cultivo microbiológico utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos.

Tiene varias propiedades que lo hacen ideal para el uso de antibióticos sobre él. En primer lugar es un medio no selectivo y no diferencial, lo que significa que prácticamente todos los microorganismos cultivados crecerán en su superficie. Por otra parte, es un agar suelto, lo que permite una mejor difusión de los antibióticos (a diferencia de en otros medios con mayor proporción de agar), por lo que se observarán las zonas de inhibición verdaderas. Además, contiene almidón, que absorberá las toxinas liberadas por las propias bacterias, de modo que no interfieran con los antibióticos.

- **Composición**:

- Extracto de carne
- Hidrolizado de caseína
- Almidón
- Agar

- **Preparación**:

Disolver 34 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Autoclavar (15 minutos a 121°C). Verter en placas Petri.

Anexo 02. Descripción de los medios diferenciales:

- **TSI (Triple azúcar hierro)**

Para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

- **Composición:**

- Extracto de carne
- Cloruro de sodio
- Glucosa
- Lactosa
- Sacarosa
- Sulfato de hierro y amonio
- Tiosulfato de sodio
- Rojo de fenol

Tabla 5.
Tabla de identificación bioquímica para TSI.

Bacterias	Reacción
Escherichia coli	A[1]/A
Shiguella flexneri	K[2]/A
Salmonella typhimurium	K/A
Pseudomona aeruginosa	K/K

[1]A = Hay consumo de carbohidratos (Acidificación).
[2]K = No hay consumo de carbohidratos.

- **LIA (Lisina hierro)**

- **Composición:**

- Peptona
- Extracto de levadura
- Glucosa
- Lisina
- Citrato de hierro y amonio
- Tiosulfato de sodio
- Púrpura de bromocresol

Tabla 6.
Tabla de identificación bioquímica para LIA.

Bacterias	Reacción
Escherichia coli	K/K
Shiguella	K/A
Salmonella	K/K
Proteus	R/A

- **Preparación:**

Disolver 32 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Poner en tubos de ensayo y autoclavar (15 minutos a 121°C)

➢ Citrato de Simmons

Método usado para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como como única fuente de carbono y energía.

- Composición:

- Citrato de sodio
- Cloruro de sodio
- Fosfato dipotásico
- Fosfato monoamónico (única fuente de nitrógeno)
- Sulfato de magnesio
- Azul de bromotimol

Tabla 7.
Tabla de interpretación para Citrato de Simmons

Bacteria	Crecimiento	Color del medio
Escherichia coli	Negativo	Verde
Shiguella	Negativo	Verde
Salmonella	Satisfactorio	Azul
Pseudomona	Satisfactorio	Azul
Klebsiella	Satisfactorio	Azul

- Preparación:

Disolver 22.5 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Verter en tubos de ensayo y autoclavar (15 minutos a 121°C).

➢ SIM

El trifosfato es un componente de muchas peptonas, particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por las bacterias que tienen la enzima triptofanasa en la producción de indol, que puede ser evidenciado por el reactivo de kovacs.

- Composición:

- Tripteína
- Peptona
- Sulfato de hierro y amonio
- Tiosulfato de sodio

- <u>Preparación</u>:

Disolver 31 g en un litro de agua desmineralizada. Calentar en agua hirviente hasta la disolución completa. Verter en tubos de ensayo y autoclavar (15 minutos a 121°C).

- **Técnica de Indol**

Esta prueba detecta la liberación del indol. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa degradan el aminoácido triptófano y liberan el indol, que es detectado por el reactivo de kovacs que contiene p-dimetilaminobenzaldehido.

Al agregar 4 gotas de reactivo de kovacs al tubo con MIO donde se inoculo la cepa del cultivo se observara la formación de un anillo color rojo en la superficie.

Tabla 8.
Tabla de interpretación para la técnica de Indol.

Bacteria	**Movilidad**	**Indol**
Escherichia coli	+	+
Shiguella	-	-
Salmonella	+	-
Proteus	-	-
Klebsiella	+	-

Anexo 03. Panel fotográfico.

Figura 02. Muestra de leche de vaca con mastitis clínica.

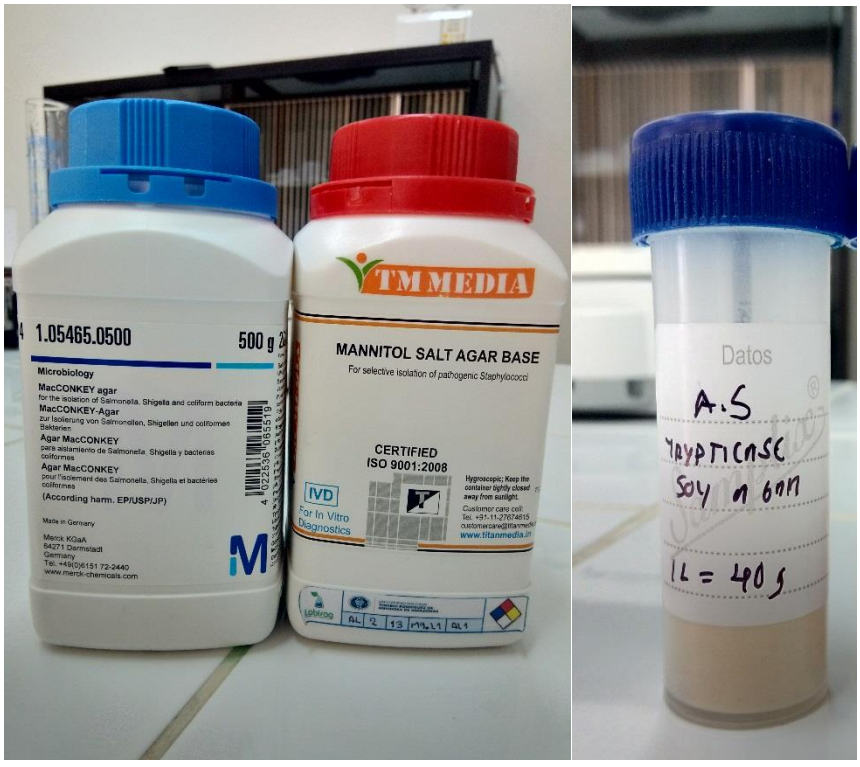


Figura 03. Agares usados en la investigación para sembrar bacterias.

Figura 04. Preparación y auto clavado de los agares.

Figura 05. Llenado de las placas Petri con los agares.

Figura 06. Agares para la identificación de las bacterias causantes de las mastitis.

Figura 07. Centrifugado de muestra de leche para sembrar en las placas Petri.

Figura 08. Sembrado e incubación de las bacterias de la mastitis clínica.

Figura 09. Resultados de la identificación de *Escherichia coli* (izquierda) y *Streptococcus agalactiae* (derecha) después de 24 horas de incubación.

Figura 10. Obtención del extracto de ajo.

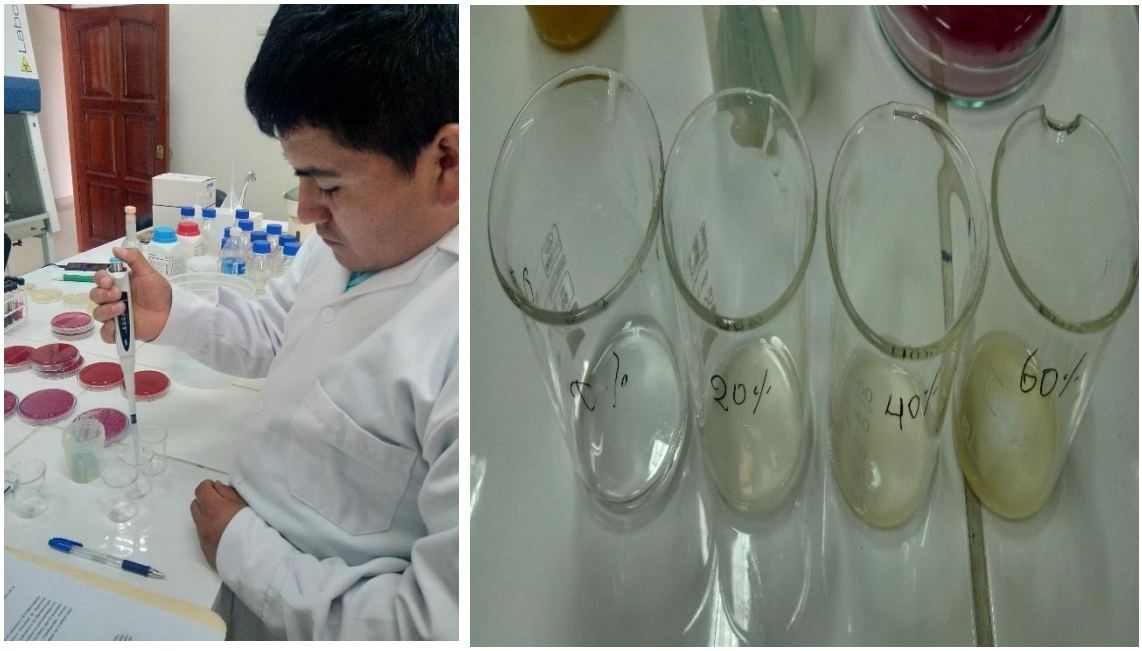


Figura 11. Preparación de los tratamientos.

Figura 12. Remojado de los discos de sensibilidad en los tratamientos.

Figura 13. Colocación de los discos de sensibilidad en las placas Petri para la evaluación del efecto antibacteriano.

Figura 14. Incubación de las placas Petri para medir el efecto antibacteriano de EA.

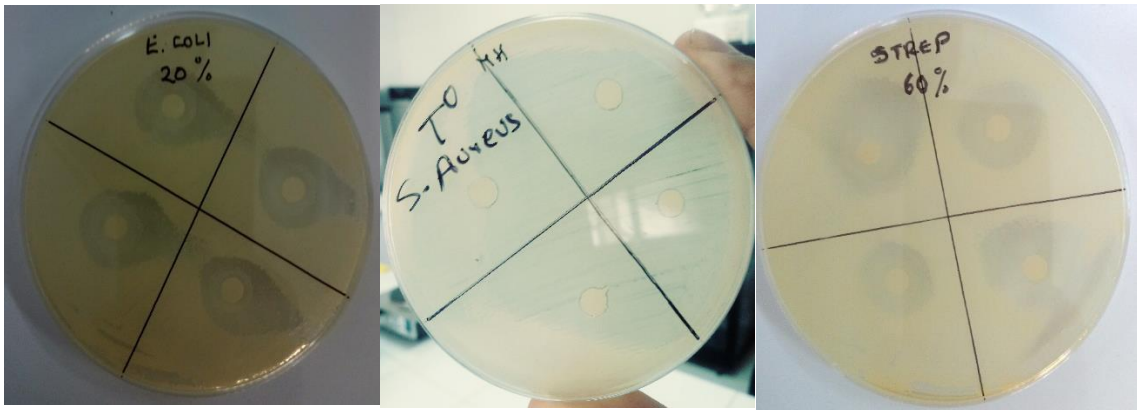


Figura 15. Resultado final del efecto antibacteriano (diámetro del halo) en *Escherichia coli*, *Staphyloccocus aureus* y *Streptococcus agalactiae.*

Anexo 4. Figuras estadísticas.

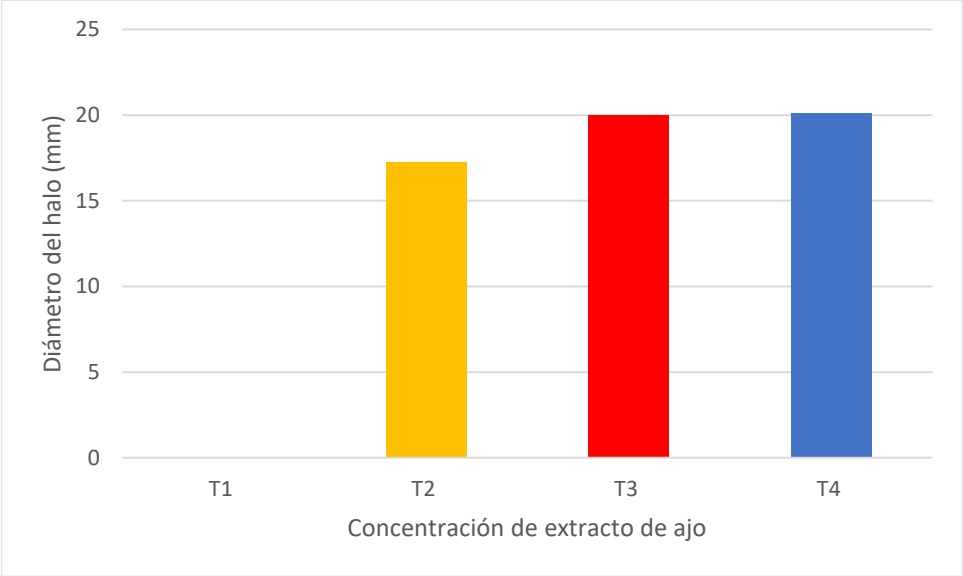


Figura 16. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente a la *Escherichia coli*

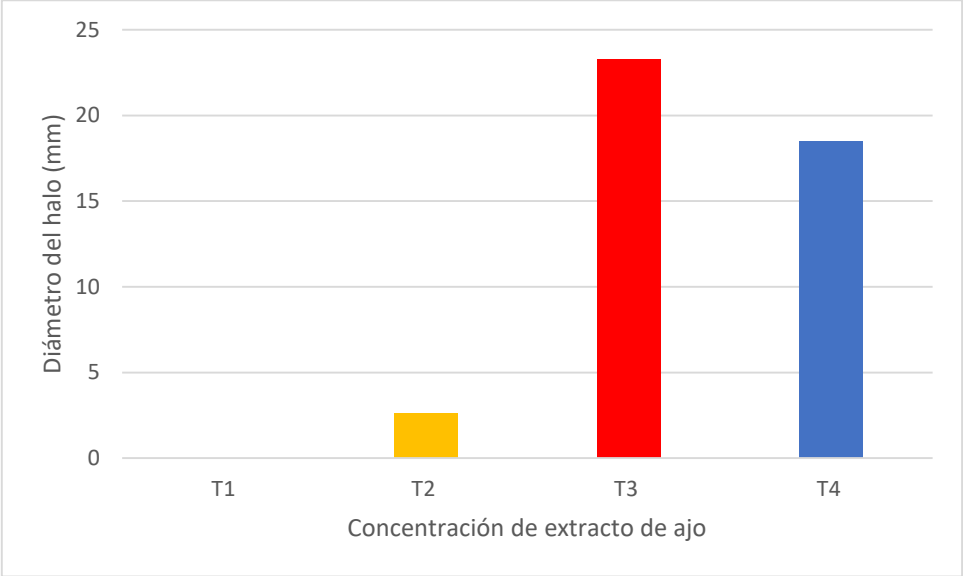


Figura 17. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente al *Staphyloccocus aureus*

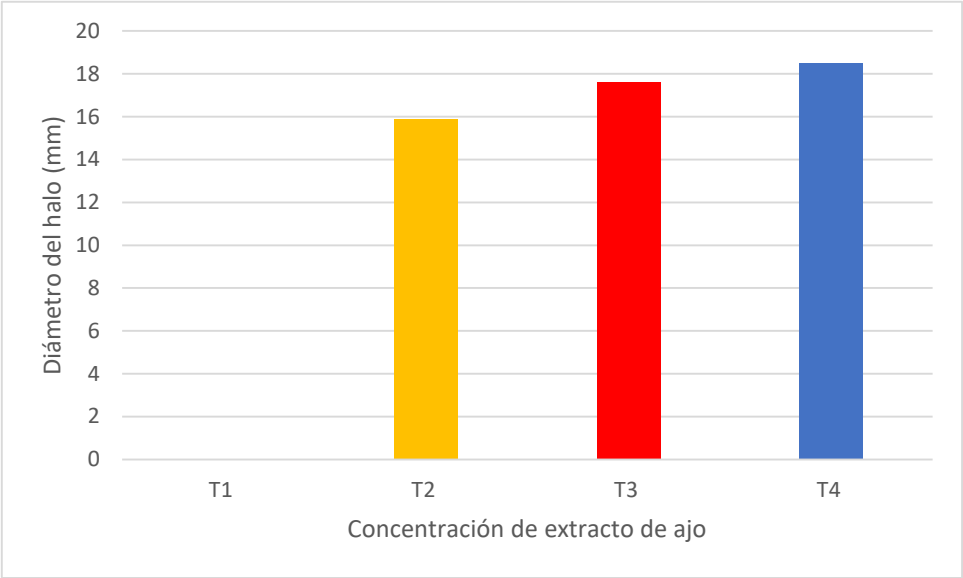


Figura 18. Efecto antibacteriano del extracto de ajo frente al *Streptococcus agalactiae*.