

Uso potencial de extractos de Creosote bush (*Larrea tridentata*) como desinfectante sobre *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas

S. López-Aguirre^{1,2}, J.M. Pinos-Rodríguez², G. Álvarez-Fuentes³, J.C. García-López^{3,*} y H. Méndez-Cortés¹

¹ Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, C.P. 78000, San Luis Potosí, México

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, C.P. 91710, Veracruz, México

³ Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, C.P. 78377, San Luis Potosí, México

Resumen

Se evaluaron extractos de hojas de Creosote bush para control de *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas. Se determinaron el disolvente y la técnica que obtuvieran la mayor proporción de material extractable, *in vitro*; se determinó su capacidad bactericida y se evaluó la capacidad para desinfectar instalaciones avícolas, comparando desinfección con Creosote (DC), desinfección de rutina (DR) y vacío sanitario (VS). Al término de la desinfección, se colectaron muestras en piso, pared, techo y cortina. Se sembraron en medio selectivo, se realizaron pruebas bioquímicas diferenciales y se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC). El análisis de varianza se realizó con el procedimiento GLM y la comparación de medias por Tukey, con el programa SAS. Usando agua y proceso de decocción, con 40 minutos de extracción, se obtuvo el mayor porcentaje de material extractable (36,43%), la menor concentración bactericida (300 mg mL⁻¹) y halos de inhibición de 13 mm. En la pared disminuyeron las UFC con DC, en techo y cortinas fueron similares con DC y DR, en piso fueron menores con DR. Se concluye que el extracto acuoso de hojas de Creosote bush es una alternativa de desinfección eficaz para control de *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas.

Palabras clave: Concentración mínima bactericida, concentración mínima inhibitoria, decocción, disolventes, infusión.

Potential use of Creosote bush extract as disinfectant on *Salmonella typhimurium* for broiler pens

Abstract

Extracts of Creosote bush leaves were evaluated for control of *Salmonella typhimurium* in poultry pens. Solvent and the technique that obtained the highest proportion of extractable material, *in vitro*, were determined; its bactericidal capacity was determined and the capacity to disinfect poultry pens was eva-

* Autor para correspondencia: jcgarcia@uaslp.mx

luated, comparing disinfection with Creosote bush (DC), routine disinfection (DR) and sanitary vacuum (VS). At the end of the disinfection, samples were collected in floor, wall, ceiling and curtain. Seeded in selective medium, differential biochemical tests were performed and colony forming units (CFU) were calculated. The analysis of variance was performed with the GLM procedure and the comparison of means by Tukey, with the SAS software. Using water and the decoction process, with 40 minutes of extraction, the highest percentage of extractable material (36.43%), the lowest bactericidal concentration (300 mg mL⁻¹), and inhibition halos of 13 mm were obtained. On the wall, the CFU with DC decreased, while in ceiling and curtains they were similar with DC and DR and in floor, lower with DR. It is concluded that the aqueous extract of Creosote bush leaves is an effective disinfection alternative for control of *Salmonella typhimurium* in poultry pens.

Keywords: Minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, decoction, solvents, infusion.

Introducción

A nivel mundial, *Salmonella* es uno de los patógenos que causa gastroenteritis en humanos. Las infecciones por el serovar *typhimurium*, generalmente, se asocian con el consumo de carne de aves o huevos contaminados. El control de la bacteria es fundamental, debido a que ha desarrollado resistencia a los compuestos antimicrobianos disponibles para su tratamiento (Buzby et al., 2001; Fàbrega y Vila, 2013) y por su habilidad para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el ambiente, particularmente en presencia de materia orgánica (Argüello et al., 2011). Las instalaciones (galpones, comederos, bebederos) de los sistemas de producción avícola son la principal fuente de transmisión entre aves y sus productos, para prevenirlo, al término del ciclo productivo se realizan desinfecciones con productos químicos, como los surfactantes ácidos aniónicos, surfactantes anfotéricos, bromuros, cloruros, clorhexidina, yoduros, compuestos fenólicos, alcohol, amonio cuaternario entre otros. Su mecanismo de acción depende del sitio blanco donde actúan en los microorganismos (Cabrera et al., 2007; Arreguín y Macías, 2012), con la desventaja de ser tóxicos para el hombre y contaminante del ambiente (Block, 2001; Lira-Saldívar et al., 2006), por lo que al término, se debe de realizar un lavado con agua y ja-

bón para eliminar residuos (Parra et al., 2002; Rojas et al., 2002), generando un gasto de grandes volúmenes de agua. Es por ello que se han explorado alternativas menos contaminantes como el ozono (Chih-Shan y Yu-Chun, 2003), el oxígeno ionizado (Higgins et al., 2005) así como la búsqueda de nuevas estrategias empleando fitoquímicos presentes en las plantas nativas de cada región. Una alternativa podría ser el uso de extractos de Creosote bush, arbusto perenne característico de los desiertos Chihuahuense, Sonorense y Mojave, el cual contiene diversos metabolitos secundarios (ácido nordihidroguayarético, NDGA; 3'-O-metilnordihidroguayarético; Nor-3'-demetoxisoguayacina; Nor-isoguayacina; 3'-Demetoxisoguayacina; 6,3'-Di-O-demetilisoguayacina; el lignano (7R, 7'R)-7,7'-bis(4', 3, 4-trihidroxifenilo)-(8R, 8'S)-8, 8'-dimetilte-trahidrofurano y el flavonol 3-metoxi-6,7,4'-trihidroxiflavonol), identificados como eficaces compuestos antiparasitarios (Bashya et al., 2017). Experimentos *in vitro*, han demostrado que tiene acción antifúngica contra 17 hongos fitopatógenos; al ser agregada al suelo, inhibe el crecimiento de hongos, además tiene efecto nematocida y nematostático. Bacterias, levaduras, hongos y parásitos intestinales en humanos, también son susceptibles a esta planta (Lira-Saldívar et al., 2006). Posee actividad antioxidante, anti-VIH, inhibitoria de enzimas y antitumoral (Gnabre et

al., 2015; Guzmán-Beltrán et al., 2016), destacando que en la revisión de literatura realizada, su uso como desinfectante en instalaciones pecuarias, no ha sido reportado. Por lo tanto, el objetivo de este estudio, fue determinar la técnica y el disolvente que permita obtener la mayor proporción de material extractable de hojas de Creosote bush, y evaluar su uso como desinfectante para control de *Salmonella typhimurium* al aplicarlo en instalaciones avícolas.

Material y métodos

Experimento 1. Obtención, cuantificación de material extractable y estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *S. typhimurium*

Material vegetal

Las muestras vegetales se colectaron en el municipio de Matehuala, en la localidad "Cerrito Blanco" coordenadas latitud: 23.6667 y longitud: -100.583 en San Luis Potosí. De las plantas seleccionadas se cortó únicamente el último tercio de la copa, para preservarlas y asegurar el rebrote (Bruneton, 2001). Un ejemplar completo se colectó e identificó y se depositó en el herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las muestras se limpiaron y se secaron a la sombra hasta peso constante, una vez secas, se separaron las hojas de los tallos. Las hojas se molieron hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1 mm (Thomas Wiley mill, Thomas Scientific LLC, Swedesboro, NJ, EEUU) y se almacenaron en un recipiente de vidrio oscuro a temperatura del medio (22°C) para su posterior uso.

Obtención y cuantificación de material extractable

La obtención de material extractable de la hoja de Creosote bush, se realizó por proceso de infusión, con cinco tiempos de extracción (calentamiento): 0, 10, 20, 30 y 40 minutos, usando tres diferentes disolventes: agua desionizada (AI), etanol (E) y metanol (M) al 90% v/v. 1 g de las hojas secas y molidas se colocaron en tubos de ensayo (20 x 200 mm) y se adicionaron 40 mL de cada uno de los disolventes previamente mencionados, se agitaron y se sumergieron en baño serológico (Fisherbrand, Hampton, Nuevo Hampshire, EEUU) a temperatura de 65°C constante y agitación programada cada 5 minutos; además se evaluó un método de decocción usando únicamente agua desionizada como disolvente (AD), el cual consistió en elevar la temperatura de la suspensión (1 gramo de planta y 40 mL de agua) hasta 98°C con los mismos tiempos de extracción. Al término de cada tiempo, los tubos se retiraron del baño serológico, se filtraron por vacío a través de papel wathman número 4 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU), se dejaron enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente (22°C), posteriormente, previa agitación, se colectó 1 mL de cada tubo y se transfirió a un crisol identificado, seco y pesado y se colocó en una estufa de desecación por aire forzado (Modelo 509076, Labolan, España) a 96°C durante 48 horas. La cuantificación de material extractable, se determinó por diferencia de peso final y peso inicial. Este procedimiento se realizó tres veces, con una semana de diferencia entre proceso (replicas), usando tres tubos por disolvente y por tiempo de calentamiento (repeticiones).

Concentración del material extractable

Se repitió el procedimiento usando 25 gramos del material vegetal para obtener 1 L de suspensión. Las suspensiones obtenidas usando E y M, se concentraron en un rotavapor (Buchi R-124 y Watherbarth B-481, Labor Technik AG, Alemania) con presión reducida a 55°C, y las obtenidas usando AI y AD se concentraron en una olla de impregnación al vacío Gastrovac (International Cooking Concepts, Barcelona, España), a 55°C, acoplada a un destilador durante 45 minutos. Los concentrados acuosos y alcohólicos obtenidos se llevaron a sequedad total en estufa de desecación por aire forzado a 50°C durante 48 horas.

Métodos de estudio de susceptibilidad antimicrobiana de S. typhimurium a los extractos de Creosote

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de Creosote sobre *S. typhimurium*, se usó la cepa ATCC 14028, serotipo B, donada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de San Luis Potosí, México. Las pruebas de sensibilidad se realizaron de acuerdo a los métodos estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2017); el medio de cultivo fue caldo tripticasa de soya (Becton, Dickinson and Company, EEUU) para la técnica de microdilución en caldo, usando un equipo Sensititre ARIS 2X (Thermo Scientific), y agar mueller-hinton (Becton, Dickinson and Company, EEUU) para la técnica de pozos en agar. Las concentraciones del extracto evaluado fueron 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg mL⁻¹ de agua estéril, y únicamente agua estéril como control positivo de crecimiento; como control negativo se usó el antibiótico ceftriaxona solución inyectable (PISA Farmacéutica, Guadalajara, Jalisco, México) en concentración de 100 mg mL⁻¹. Además se elaboraron las gráficas de relación

entre los puntos de corte de la técnica de microdilución y el diámetro de los halos de inhibición de los extractos de Creosote sobre *S. typhimurium* como lo describen Taroco et al. (2006) para determinar los criterios de sensibilidad y resistencia a cada extracto.

Análisis estadístico

Los resultados de la tasa de extracción se analizaron en un diseño completamente al azar, el análisis de la varianza se efectuó utilizando el procedimiento para modelos lineales generales (PROC GLM) del programa SAS (2008), incluyendo la réplica en el modelo (Pinos-Rodríguez et al., 2002). La comparación de medias, se realizó por prueba de Tukey del paquete estadístico SAS (2008).

Experimento 2.

Desinfección de instalaciones

Para comprobar el efecto bactericida del extracto contra *S. typhimurium*, se realizó una prueba de desinfección de instalaciones. Este experimento se realizó en una granja de aves del municipio de Rio Verde, San Luis Potosí, adecuándose a las políticas internas de la granja. Se usaron nueve galpones (10 m de ancho, 100 m de largo y 4 m de alto a la cumbre). Al término del ciclo de engorda y salida de los pollos, los galpones se cerraron durante 24 horas (vacío sanitario), posteriormente se abrieron y con pala mecánica se retiró la pollinaza (heces de los pollos).

Cada uno de los siguientes tratamientos se aplicó aleatoriamente a tres galpones:

1) Desinfección de rutina (DR), el lavado se realizó tallando las superficies con una solución al 5% de detergente en polvo DLM-300 (Química Vita S.A. de C.V., México) y enjuagando conforme se aplicaba; se dejó secar durante 24 horas. Al término de este tiempo, se realizó un segundo lavado con una solución de Biosolve® (Bayer de México S.A. de C.V., Mé-

xico), 150 mL disueltos en 15 L de agua, se enjuaga y se dejó secar 24 horas. Posteriormente, se roció una solución de hipoclorito de sodio al 5% (Ácidos y Solventes S.A. de C.V., México), una vez seco, se desinfectó usando el producto comercial Farm Fluid® (Bayer de México S.A. de C.V., México) empleando una dilución 1:200, posteriormente, se aplicó el producto comercial SPF 11-15® (Sanfer, México) en una dilución de 1:1000, ambos, utilizando un termonebulizador (SSF-200, Swissmex, México) transcurriendo un tiempo de 24 horas entre aplicaciones y lavando con agua al finalizar la desinfección.

2) Desinfección con Creosote (DC): Del material extractable por el método de decocción, se preparó un solución con 400 mg mL⁻¹ de agua (pH 3,2), se roció usando una aspersora motorizada de mochila portátil (Campera 4T Swissmex, México) con caudal de 7,1 L min⁻¹ y se dejó secar durante 24 horas.

3) Vacío sanitario (VC), únicamente se usó como método de desinfección el vacío sanitario anteriormente mencionado.

Este procedimiento se realizó durante tres ciclos de engorda consecutivos (replicas).

Toma de muestras y conteo bacteriano

En los galpones, se marcaron al azar en el piso, la pared, el techo y la cortina, 10 cuadros de 25 cm², (5 x 5 cm), distribuidos aleatoriamente. Las tomas de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de la granja, para ello se realizó un frote con hisopos estériles en los cuadros delimitados y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución amortiguadora de fosfato salino (Becton, Dickinson and Company, EEUU). Inmediatamente después se trasladaron al laboratorio de control de calidad de la granja. De cada uno de estos tubos se tomó una alícuota de 20 µL, se sembraron en placa con medio *Salmonella Shigella* (Becton, Dickinson and Company, EEUU) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Al

finalizar, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC), identificadas por su color beige con centros blancos, y se realizaron los cálculos para obtener el número de UFC por metro cuadrado.

Pruebas bioquímicas diferenciales realizadas a las colonias aisladas

De las UFC, aisladas en las diferentes partes del galpón, se tomaron aleatoriamente 3 UFC por sitio de muestreo (piso, pared, techo y cortina), se colocaron en tubos de ensayo de 12 x 75 mm que contenían 3 mL de solución salina estéril (Becton, Dickinson and Company, EEUU), se ajustó la turbiedad a 0,50 unidades de la escala de McFarland con un densitómetro DensiChek (Biomérieux, Francia). Para realizar las pruebas bioquímicas diferenciales y confirmar el serovar *typhimurium*, se utilizó un equipo VITEK 2 (Biomérieux, Francia).

Análisis estadístico

El número de UFC se transformó a logaritmo natural para que cumplieran con homogeneidad de varianza y se analizaron en un diseño completamente al azar. El análisis de varianza se efectuó utilizando el procedimiento para modelos lineales generales (PROC GLM), la comparación de medias, se realizó por prueba de Tukey del paquete estadístico SAS (2008).

Resultados y discusión

Experimento 1

Obtención del material extractable

En relación a la obtención y cuantificación de material extractable, el uso de los disolventes al igual que los tiempos de calentamiento para la extracción, mostraron diferencia significativa ($P < 0,01$). Usando agua con el proceso de decocción se obtuvo el mayor por-

centaje de extracción, (36,43%, Tabla 1), no se encontró efecto de la interacción disolvente por tiempo ($P > 0,01$). Los diversos disolventes usados para obtener los extractos, tales como etanol, metanol (Tequida-Meneses et al., 2002; Martins et al., 2009; Martins et al., 2013;) y acetona (Moreno-Limón et al., 2011; Martins et al., 2012) entre otros, así como los diferentes métodos, entre los que se citan el de reflujo en equipo soxlet (Lira-Saldívar et al., 2006), extracción asistida por microondas (Martins et al., 2009) o por remojo (Tequida-Meneses et al., 2002) y el tiempo en el proceso de extracción, los cuales varían desde 1 minuto (Martins et al., 2009) hasta 13 días (Moreno-Limón et al., 2011), son factores que en conjunto con las características físicoquímicas de los compuestos de las hojas de la planta, entre los que destacan los lignanos fenólicos, como el ácido dihidroguayaretico, el hemi-norisoguayacin y el ácido nordihidroguayaretico, flavonoides, triterpenos y saponinas (Lira-Saldívar et al., 2006),

pueden influir en el porcentaje de material extractable obtenido y la actividad antimicrobiana, lo que explicaría la inconsistencia de los resultados reportados en diversos experimentos. Al respecto de estos resultados, los porcentajes de extracción obtenidos en todos los tratamientos, son mayores a los reportados por Rhoades (1977) y Lira-Saldívar (2003), quienes obtuvieron 20% y 26% de material extractable respectivamente. Martins et al. (2012) reportó que usando metanol como disolvente, se obtiene la mayor concentración de lignanos fenólicos, compuestos a los que se les atribuyen las propiedades biocidas de los extractos, sin embargo, la toxicidad del metanol (EPA, 2013) limitaría su uso en áreas como las destinadas a la producción de alimento para consumo humano. En este estudio se demostró que el empleo de agua como disolvente, con 40 minutos de inmersión, permite extraer el más alto porcentaje de fitoquímicos de las hojas de la planta, con la ventaja que el agua no representa toxicidad como el metanol.

Tabla 1. Porcentaje de material extractable usando diferentes disolventes y tiempos de extracción.

Table 1. Percentage of extractable material using different solvents and extraction times.

Disolvente	Tiempo (min)				
	0	10	20	30	40
E	8,01 ^c	14,33 ^c	18,16 ^c	22,00 ^c	28,00 ^d
M	9,24 ^b	16,22 ^b	22,66 ^b	26,28 ^b	31,22 ^c
AI	6,10 ^c	13,17 ^c	19,28 ^c	27,52 ^c	35,57 ^b
AD	16,21 ^a	23,04 ^a	25,03 ^a	28,18 ^a	36,43 ^a
EEM	0,014	0,013	0,013	0,013	0,014

E, etanol; M, metanol; AI, agua por proceso de infusión; AD, agua por proceso por decocción. EEM= error estándar de la media. ^{a,b} Superíndices diferentes dentro de la misma columna, indican diferencia estadística significativa ($P < 0,01$).

En cuanto a las pruebas de control de *Salmonella*, usando agua como disolvente y el proceso de decocción, se encontró mayor efecto bactericida a menor dosis (Tabla 2), la concentración mínima inhibitoria se alcanzó con 200 mg mL⁻¹, con un halo de inhibición de 10 mm de diámetro y la mínima bactericida con 300 mg mL⁻¹, generando un halo de 13 mm de diámetro, lo mismo se observa en los criterios de susceptibilidad antimicrobiana según la relación entre los puntos de corte y el diámetro de los halos de inhibición (Figura 1).

El ensayo *in vitro* (Tabla 2) demostró que el extracto acuoso obtenido por decocción inhibe el crecimiento de *S. typhimurium* con una mayor eficiencia a una concentración de 150 mg mL⁻¹, generando halos de inhibición de mayor diámetro (10 mm), comparado con los extractos alcohólicos (8 mm con metanol y 9 mm con etanol). López-Aguirre et al. (2016) realizaron la identificación por espectrofotometría de los compuestos activos extraídos de hojas de Creosote usando el proceso de infusión con agua desionizada, confirmaron la

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida y diámetro de los halos de inhibición obtenidos con los extractos de Creosote bush sobre *S. typhimurium*.

Table 2. Minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration and diameter of the inhibition halos obtained with the extracts of Creosote bush on *S. typhimurium*.

Tratamiento	Concentración mínima inhibitoria		Concentración mínima bactericida	
	Dosis (mg mL ⁻¹)	Diámetro del halo (mm)	Dosis (mg mL ⁻¹)	Diámetro del halo (mm)
E	400	9	500	12
M	300	8	400	11
AI	300	10	400	12
AD	200	10	300	13
Ceftriaxona	100	20	100	20

E, etanol; M, metanol; AI, agua por proceso de infusión; AD, agua por proceso por decocción.

presencia de dos compuestos principales, el ácido nordihidroguayarático y Kaempferol, ambos pertenecen al grupo químico de los fenoles. Su mecanismo de acción en los patógenos se debe a que provoca una pérdida de sitios activos en el citoplasma y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Cabrera et al., 2007; Arreguín y Macías, 2012; Park et al., 2012). Esto sugiere que las propiedades biocidas del extracto obtenido pueden atribuirse directamente a los metabolitos presentes en las soluciones acuosas y no por efecto de disolvente como el metanol o etanol usados para su extracción.

Experimento 2

Desinfección de instalaciones

Los procedimientos de desinfección resultaron con diferencia estadísticamente significativa en relación al número de unidades formadoras de colonia (UFC). La mayor cantidad de UFC ($P < 0,01$) se presentó con el procedimiento de VS, en todos los tipos de superficie (Tabla 3). En el techo y la cortina las UFC fueron estadísticamente iguales ($P > 0,01$) con los procedimientos de DR y DC. Sin embargo, en el piso, la cantidad de UFC al apli-

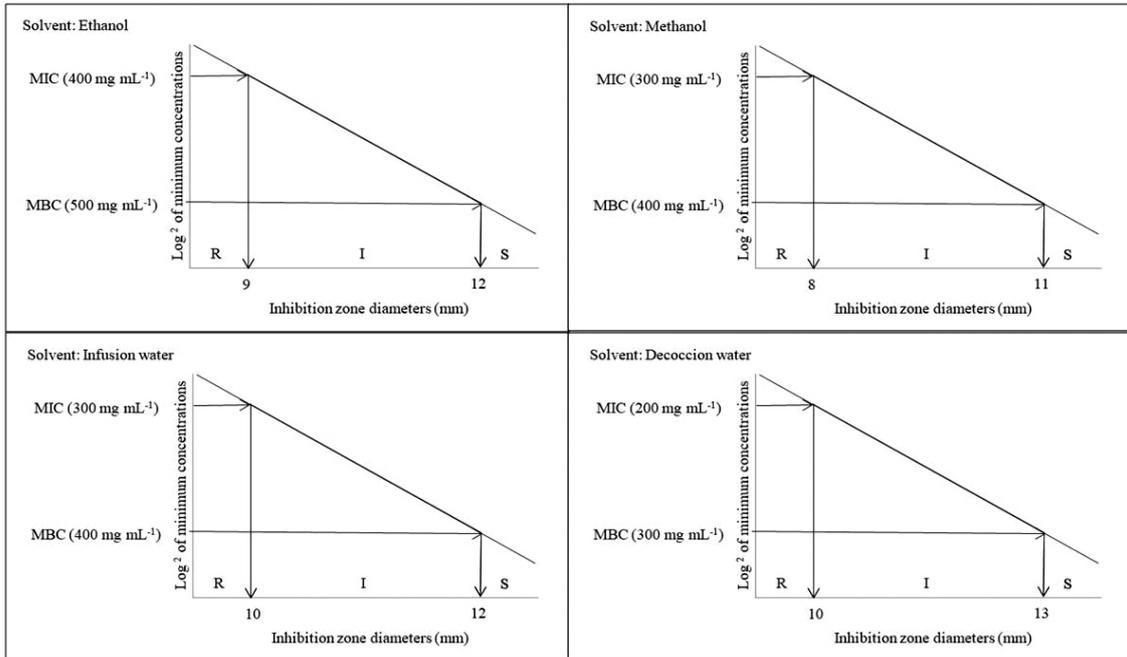


Figura 1. Criterios de susceptibilidad antimicrobiana según la relación entre el punto de corte de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC), obtenidos de la técnica de microdilución, y el diámetro de los halos de inhibición, obtenidos con la técnica de pozo en agar con extractos de Creosote bush sobre *S. typhimurium*. R = resistente, I = intermedio, S = sensible.

Figure 1. Criteria for antimicrobial susceptibility according to the relationship between the cut-off point of the minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericide (MBC), obtained from the microdilution technique, and the diameter of the inhibition halos, obtained with the well technique in agar with extracts of Creosote bush on *S. typhimurium*. R = resistant, I = intermediate, S = sensible.

Tabla 3. Numero de UFC* aisladas en las diferentes partes del galpón.
Table 3. Number of CFU isolated in the different parts of the pens.

Procedimiento	Superficie			
	Piso	Pared	Techo	Cortina
Vacío sanitario	9,6 ^a	8,0 ^a	8,4 ^a	6,9 ^a
Desinfección de rutina	6,5 ^c	7,5 ^b	7,3 ^b	5,5 ^b
Desinfección con Creosote	7,6 ^b	7,0 ^c	7,6 ^b	5,0 ^b
EEM	0,20	0,10	0,87	0,10

*UFC: Unidades Formadoras de colonias, expresadas como Ln. ^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro de la misma columna, indican diferencia estadística significativa ($p < 0,01$). EEM = Error Estándar de la Media.

car DR fue menor ($P < 0,01$) en comparación con la aplicación de DC. En tanto que en la pared el procedimiento con DC mostró una capacidad de desinfección más eficiente pues se registró una menor cantidad de UFC ($P < 0,01$), en comparación con el procedimiento de DR.

Lainez et al. (2008) mencionan que aproximadamente en el 60% de las naves avícolas se puede encontrar *Salmonella* en las instalaciones después de la limpieza y desinfección,

principalmente en comederos y bebederos, así como en las superficies, comúnmente en las de difícil acceso, como consecuencia de un fallo del programa de limpieza y desinfección realizado durante el vacío sanitario.

Identificación de microorganismos aislados

La confirmación realizada por el equipo Vitek 2 por reacciones bioquímicas al microorganismo aislado en el galpón (Tabla 4), corres-

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas por el equipo Vitek 2 aplicadas al microorganismo aislado.

Table 4. Results of the biochemical tests performed by the Vitek 2 device applied to the isolated microorganism.

Prueba Bioquímica y resultado						
Ala-Phe-Pro-Arylamidase	-	D Mannose	+	L Proline Arlamidase	+	Beta N Acetyl Galactosaminidase -
Adonitol	-	Beta Xylosidase	-	Lipase	-	Alpha Galactosidase +
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	-	Beta Alanine arytamidase pNA	-	Palatinose	+	Phosphatase +
L-Arabitol	-	L Proline Arlamidase	-	Tyrosine Arylamidase	-	Glycine Arylamidase -
D-Cellobiose	-	Lipase	-	Urease	+	Ornithine decarboxylase +
Beta-Galactosidase	-	Palatinose	-	D Sorbitol	+	Lysine Decarboxylase +
H ₂ S Production	+	Tyrosine Arylamidase	+	Saccharose / Slicrose	-	Decarboxylase base -
Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase	-	Urease	-	D Tagatose	-	L Histidine assimilation -
Gutamyl Arylamidase pNA	-	D Sorbitol	+	D Trehalose	+	Colimurate +
D Glucose	+	Saccharose / Slicrose	-	Citrate Sodium	+	Beta Glucuronidase -
Gamma Glutamyl transferase	-	D Tagatose	-	Malonate	-	O 129 Resistance (comp. Vibrio) +
Fermentation Glucose	+	D Trehalose	+	S Keto D Gluconate	-	Glu Gly Arg Arylamidase -
Beta Glucosidase	-	Citrate Sodium	+	L Lactate alkalisation	+	L Malate assimilation -
D Maltose	+	Malonate	-	Alpha Glucosidase	-	Ellman -
D Mannitol	+	Beta Alanine arytamidase pNA	-	Sliccinate alkalisation	-	L Lactate assimilation -

Interpretación realizada por el equipo Vitek 2, de acuerdo a las reacciones bioquímicas diferenciales: Organismo identificado = *Salmonella typhimurium*, 99% de probabilidad.

ponde con un 99% de seguridad a la bacteria *Salmonella* serovariedad *typhimurium*, de acuerdo a la guía de interpretación de reacciones bioquímicas diferenciales (CLSI, 2017).

La desinfección por DR, requiere del uso de diversos agentes químicos y un gasto excesivo de agua, incluye el uso de detergentes, los cuales, en condiciones de almacenamiento inadecuadas, pueden contaminarse por bacilos gram negativos, además, en los procedimientos de desinfección con productos químicos, para poder lograr su máxima eficiencia, se requiere que se aplique más de un producto, debido a los diferentes mecanismos de acción para el control de patógenos (Kahrs, 1995; Block, 2001), estos, como ya se mencionó, generalmente son tóxicos y tienen efecto residual contaminante. La menor concentración de UFC aisladas en piso y paredes, cuando se realiza DR, podría deberse, además del efecto de los productos químicos aplicados, a los lavados y enjuagues de las superficies entre aplicaciones, por efecto de arrastre de microorganismo (Kahrs, 1995; Block, 2001), efecto que no se observa en cortinas y techos por la dificultad que representa hacerles un lavado riguroso. Los compuestos fenólicos también actúan sobre los lípidos, es por ello que al aplicar el extracto de Creosote en las instalaciones, puede tener efecto directo sobre *Salmonella typhimurium*, al causarle disrupción de la membrana plasmática debido a que está formada principalmente por lípidos y proteínas (Parra et al., 2002). López-Aguirre et al. (2016) no encontraron signos de toxicidad aguda o crónica en nefrocitos, hepatocitos, perfil enzimático y parámetros bioquímicos en sangre por efecto de la ingesta de infusión de Creosote en ratas, pero si reguló la expresión génica de citoquinas TNF- α , IL-1B e IL-6, concluyendo que el uso de extractos acuosos de hojas de Creosote, en caso de ser ingeridos, no representan peligro de toxicidad.

Conclusión

El extracto acuoso de hojas de Creosote es una alternativa de desinfección natural y de fácil aplicación para control de *Salmonella typhimurium* en instalaciones avícolas comerciales, así mismo, se podría utilizar en sistemas de producción de traspatio de zonas rurales, donde las instalaciones rústicas, el acceso limitado o el alto costo de desinfectantes comerciales son factores limitantes para desinfectar sus instalaciones.

Referencias bibliográficas

- Argüello H, Rubio P, Jaramillo A, Barrios V, Garcia M, Carvajal A (2011). Evaluation of cleaning and disinfection procedures against *Salmonella enterica* at swine farms, transport and lairage facilities. 9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork. Safepork 2011. 19-22 de junio, Maastricht, The Netherlands, pp. 254-257. <https://doi.org/10.31274/safepork-180809-636>
- Arreguín V, Macías JH (2012). Asepsia, uno de los grandes logros del pensamiento. Revista Digital Universitaria 13: 1-11.
- Bashya B, Li L, Bains T, Debnath A, La Barbera DV (2017). *Larrea tridentata*: A novel source for anti-parasitic agents active against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Naegleria fowleri*. PLoS Neglected Tropical Diseases 11(8): e0005832. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005832>
- Block SS (2001). Disinfection, Sterilization, and Preservation. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Bruneton J (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales, 2ª edición. Acribia, Zaragoza, España. 1100 pp.

- Buzby JC, Frenzen PD, Rasco B (2001). Product liability and foodborne illness Food and Rural Economics Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. 41 pp. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.34059>
- Cabrera CE, Gómez RF, Zúñiga AE (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 38: 149-158.
- Chih-Shan L, Yu-Chun W (2003). Surface Germicidal Effects of ozone for Microorganisms. *AIHA Journal* 64: 533-537. <https://doi.org/10.1080/15428110308984851>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA; 320 pp.
- EPA (2013). Toxicological review of methanol (non-cancer) (CAS No. 67-56-1) In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS) September. Environmental Protection Agency Washington, DC. 212 p.
- Fàbrega A, Vila J (2013). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Review* 26: 308-41. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- Gnabre J, Bates R, Huang RC (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 5: 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.024>
- Guzmán-Beltrán S, Rubio-Badillo MA, Juárez E, Hernández-Sánchez F, Torres M (2016). Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and alpha-mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *International Immunopharmacology*. 31: 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.12.027>
- Higgins SE, Wolfenden AD, Bielke LR, Pixley CM, Torres-Rodríguez A, Vicente JL, Bosseau D, Neighbor N, Hargis BM, Tellez G (2005). Application of ionized reactive oxygen species for disinfection of carcasses, table eggs, and fertile eggs. *The Journal of Applied Poultry Research* 14: 716-720. <https://doi.org/10.1093/japr/14.4.716>
- Kahrs RF (1995). Principios generales de la desinfección. Scientific and technical review of the office international des epizooties 14(1): 143-163.
- Lainez M, Hernandis A, Marín C (2008). Limpieza y desinfección de granjas de puesta: La herramienta para luchar contra *Salmonella* spp. *Selecciones Avícolas* 19: 7-16.
- Lira-Saldívar RH (2003). Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2): 214-222.
- Lira-Saldívar RH, Hernández-Suárez M, Hernández-Castillo FD (2006). Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville. Extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(2): 211-216. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2006.05.023>
- López-Aguirre S, García-López JC, Pinos-Rodríguez JM, Yáñez-Estrada L, López-Hernández Y (2016). Chemical characterization and oral toxicity of an aqueous extract of *Larrea tridentata*. *Journal of Natural Products Resource* 2(2): 79-82.
- Martins S, Aguilar CN, De La Garza Rodriguez I, Mussatto SI, Teixeira JA (2009). Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave assisted extraction. *Book of Abstracts of MicroBiotec09*, 28-30 de noviembre, Vilamoura, Portugal.
- Martins S, Aguilar CN, Teixeira JA, Mussatto SI (2012). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology* 88: 163-167. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.020>
- Martins S, Amorim E, Peixoto Sobrinho T, Saraiva AM, Pisciotano M, Aguilar C, Teixeira JA, Mussatto SI (2013) Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products* 41: 306-311. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.037>

- Moreno-Limón, S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Avila ML, Perales-Ramírez A (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32: 193-205.
- Park JS, Brown MT, Han T (2012). Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*. *Aquatic Toxicology* 106-107: 182-188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.004>
- Parra M, Durango J, Máttar S (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba* 7(2): 187-200. <https://doi.org/10.21897/rmvz.521>
- Pinos-Rodríguez JM, González Muñoz SS, Mendoza Martínez GD, Martínez Garza A (2002). Análisis estadístico de experimentos de digestibilidad *in vitro* con forrajes. *Interciencia* 27(3): 143-146.
- Rhoades DF (1977). Integrated antiherbivore, antidesiccant and ultraviolet screening properties of Creosote bush resin. *Biochemistry and Systematics Ecology* 5: 281-290. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(77\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0305-1978(77)90027-8)
- Rojas MJ, García M, Masdeu V (2002). Resultados del análisis microbiológico de yacijas de paja de arroz utilizadas en la avicultura. *Revista Cubana de Ciencia Avícola* 26: 121-123.
- Statistical Analysis System (SAS) (2008). *Statistics Software*. Release 9.1.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Taroco R, Seija V, Vignoli R (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. en: *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (Ed. Departamento de Bacteriología y Virología. Instituto de Higiene), pp. 663-671. Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Tequida-Meneses M, Cortez-Rocha M, Rosas-Burgos EC, López-Sandoval S, Corrales-Maldonado C (2002). Effect of alcoholic extracts of wild plants on the inhibition of growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium poae* moulds. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 84-88.

(Aceptado para publicación el 18 de febrero de 2020)