

Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica, del efecto del aceite esencial de orégano Mexicano y quitosano, sobre células de *Vibrio cholerae* No-01.

Paredes-Aguilar, M.C.^{1,2}, Miki-Yoshida, M.³, Ballinas-Casarrubias, M.L.¹, Nevárez-Moorillón, G.V.^{1*}

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, México

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD-Unidad Guaymas) Guaymas, Sonora, Mexico.

³ Centro de Investigación en Materiales Avanzados, Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua, México.

*Autor de correspondencia: vnevare@uach.mx

INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años, la búsqueda de nuevos antimicrobianos que auxilien en el control de microorganismos en diferentes ambientes ha sido de gran interés. Además, el uso de extractos derivados de plantas y animales para su uso en alimentos, está de acuerdo con las tendencias ambientalistas actuales. El uso de aceites esenciales como aditivos en alimentos, o el uso de películas de recubrimiento con extractos derivados de animales, son consideradas alternativas para el uso de antimicrobianos naturales; dos de estos extractos son el orégano y el quitosano [1,2]. Aún cuando se ha estudiado la efectividad antimicrobiana de estos compuestos, aún falta trabajo por realizar en relación a su mecanismo de acción. La microscopía de fuerza atómica (AFM) se ha utilizado en la observación de células bacterianas, con muy buenos resultados. Entre las ventajas de la técnica, las células no requieren de mucha preparación, además que se pueden observar las células vivas y aún estructuras subcelulares. En la observación de células completas, los resultados son similares a los obtenidos en microscopía electrónica de barrido [3,4].

OBJETIVO

Evaluar el efecto de aceite esencial de orégano Mexicano y quitosano sobre células de *Vibrio cholerae* no-01, utilizando Microscopía de Fuerza Atómica.

METODOLOGÍA

Las muestras se prepararon en una base plana de vidrio de 1 cm², a la que se le adhirió una capa uniforme de agarosa de aproximadamente 5 mm de espesor. Sobre esta superficie, se adicionaron 10 µ L del cultivo bacteriano (24 h, 35°C) ajustados a una concentración de 1.5×10^8 células/mL, además de una alícuota de aceite esencial de orégano Mexicano (200 mg/L) o una solución de quitosano de alto peso molecular (1000 mg/L) y se homogeneizó perfectamente; como control, se prepararon células sin adición de antimicrobiano. Las muestras se incubaron a 35°C (20 minutos para el aceite esencial de orégano, 12 h para el quitosano) y se observaron en MFA. Se utilizó un microscopio de fuerza atómica (MFA) Digital Instruments-Veeco, modelo MMAFMLN-AM; equipado con un objetivo 10X, un controlador diNanoScope IVa Veeco con pantalla Trinitron Sony y equipo de cómputo Veeco con software de imagen versión 5.3. La base de vidrio se fijó en una base metálica, que se montó sobre el microscopio. El barrido se realizó en diferentes campos de la muestra, mediante contacto intermitente del láser [4].

RESULTADOS

Las imágenes obtenidas en el MFA, permitieron observar el daño estructural causado en las células de *Vibrio cholerae* no 01 tratadas con esos compuestos, en comparación a las imágenes de la bacteria sin ningún tratamiento. en la Figura 1, se observan células de *V. cholerae* no 01 (control) en escalas de campo visual de 15 μm y 10 μm , obtenidas a una distancia de contacto intermitente de 300 nm. En esta figura se pueden ver claramente las estructuras celulares muy bien definidas, tanto en forma como en lo referente a su pared celular.

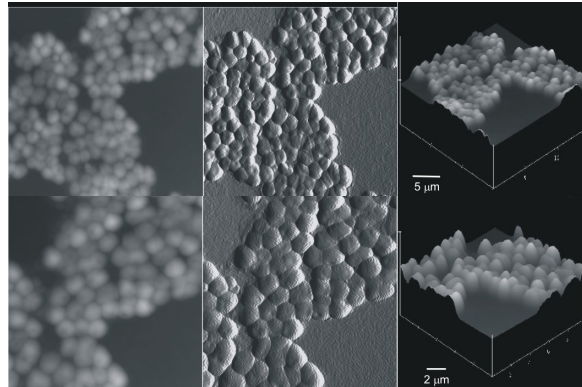


Figura 1. Células de *V. cholerae* no 01 observadas mediante microscopía de fuerza atómica, con campos de barrido de 15 μm y 10 μm . Imágenes: topográfica, contraste de fase y tridimensional.

El aceite esencial de orégano Mexicano causó la muerte de la célula al contacto con el microorganismo. La figura 2 muestra que las bacterias perdieron completamente su estructura. Se sugiere que las células bacterianas perdieron su contenido interno al verse favorecido el aumento de permeabilidad de la pared celular, seguida por su rompimiento.

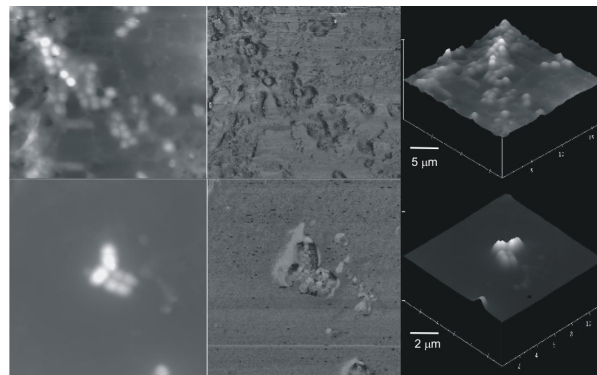


Figura 2. Imágenes de MFA (topográfica, contraste de fase y tridimensional) de células de *V. cholerae* no 01 tratadas con el aceite esencial de orégano Mexicano (100 mg/L), a dos campos de barrido (15 μm y 10 μm) a una distancia de contacto intermitente de 1 500 y 1 200 nm respectivamente.

Lo anterior concuerda con el mecanismo de acción propuesto en algunos trabajos, que indican que los compuestos activos de los aceites esenciales, provocan un rompimiento de la membrana celular [1, 5]. En general, se puede observar que el contenido interno y todos los componentes celulares, se encuentran derramados y extendidos sobre la superficie del campo de barrido; solo se puede observar una capa indefinida de los diferentes componentes mezclados.

La figura 3, muestra el daño estructural provocado por el quitosano a 1 000 ppm sobre las células de *V. cholerae* no 01, observado a una distancia de contacto intermitente de 250 nm y en un área de barrido de 10 μm y 5 μm . Las imágenes obtenidas en el campo de barrido de 10 μm , muestran la pérdida del contenido intracelular y la modificación que sufrieron las células en su estructura (forma). A 5 μm , se puede observar detalladamente que la bacteria no modificó su forma; sin embargo se puede observar que la célula aumentó su tamaño (en comparación con el control) y que el quitosano causó que la bacteria sufriera un hundimiento o perforación en el centro. Esto sugiere que el quitosano se adhiere a la superficie de las células bacterianas, lo que provoca que se vean atrapadas, se dificulte su desarrollo normal y pierdan su contenido celular, provocando finalmente su muerte. Lo anterior concuerda con uno de los mecanismos propuestos para la acción del quitosano como antimicrobiano, que sugiere que el quitosano actúa en la superficie externa del microorganismo, dañando la membrana celular [6,7].

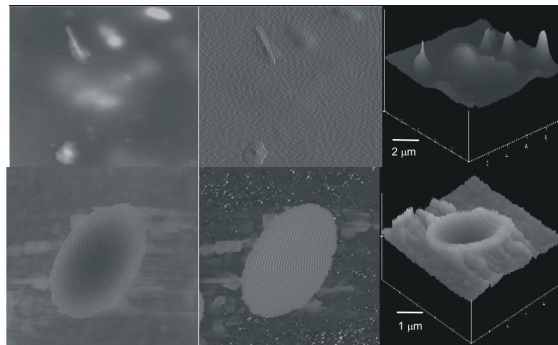


Figura 3. Imágenes (horizontal: topográfica, fase y tercera dimensión) de *V. cholerae* no 01 tratadas con quitosano (1000 mg/L), obtenidas en el MFA en dos campos de barrido (10 μm y 5 μm) y a una distancia de contacto intermitente de 250 nm.

CONCLUSIONES

La microscopía de fuerza atómica permitió detectar el daño estructural causado en las células de *Vibrio cholerae* no 01, al ser tratadas con antimicrobianos naturales: quitosano de alto peso molecular, y aceite esencial de orégano Mexicano. Los efectos sobre la membrana sugieren que los mecanismos de acción son diferentes.

REFERENCIAS

- [1] Robert Lambert, J Appl Microbiol, 91 (2001) 453-462.
- [2] Mohammad Avadi, European Polymer Journal, 40 (2004) 1355-1361.
- [3] Megan E. Núñez, Biophysical J 84, (2003) 3379-3388.
- [4] Anastassia V. Bolshakova, Biotechnol Prog, 20 (2004) 1615-1622.
- [5] Mounia Oussalah, J Food Prot, 69 (2006) 1046-1055.
- [6] Entsar I. Rabea, BioMacromol 4, (2003) 1457-1465.
- [7] Heike Möller, J Agric Food Chem 52, (2004) 6585-6591.