



Trabajo Fin de Grado

Estudio de la expresión génica microbiana frente a antimicrobianos de origen natural mediante el empleo de fusiones transcripcionales.

Autor/es

Daniel Berdejo Martínez

Director/es

Rafael Pagán Tomás
Diego García Gonzalo

Facultad de Veterinaria
Curso 2014-2015

INDICE

1. Resumen (abstract)	Pág. 3
2. Introducción	Pág. 5
3. Justificación y Objetivos	Pág. 13
4. Metodología	
1. Microorganismos y medios de cultivo	Pág. 15
2. Tratamientos de carvacrol sub-inhibitorios	Pág. 17
3. Tratamiento de inactivación con carvacrol	Pág. 18
4. Ensayo de la actividad β-Galactosidasa	Pág. 19
5. Análisis estadístico	Pág. 21
5. Desarrollo (Resultados y Discusión)	
1. Respuesta bacteriana frente a tratamientos sub-inhibitorios	Pág. 22
2. Respuesta bacteriana frente a tratamientos de inactivación	Pág. 26
6. Conclusiones (conclusions)	Pág. 32
7. Aportaciones en materia de aprendizaje	Pág. 34
8. Bibliografía	Pág. 35

1. Resumen

En la actualidad, las toxiinfecciones alimentarias son una de las principales causas de atención sanitaria en la Unión Europea, entre otros agentes causantes, se encuentra la bacteria *Escherichia coli*. El impacto de los brotes de origen alimentario, junto al elevado deterioro y desperdicio de los alimentos, exigen prolongar la vida útil de los alimentos manteniendo y asegurando su inocuidad. Para su consecución, muchos esfuerzos van destinados al desarrollo y aplicación de sistemas de conservación, por ejemplo el empleo de antimicrobianos naturales, sin embargo en ocasiones su utilización se encuentra limitado en la industria alimentaria. El empleo de herramientas moleculares, como el ensayo de la actividad β -galactosidasa, permite el estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana frente a los métodos de conservación de los alimentos, a través de la evaluación de expresión génica, con objeto de una conservación más eficiente, y que asegure la protección del consumidor. El objetivo final de esta investigación fue el uso de esta técnica para evaluar la respuesta de *E. coli* frente a tratamientos sub-inhibitorios y letales de carvacrol.

Este estudio evidenció que las respuestas microbianas de la bacteria *E. coli* frente al carvacrol varió en función de la intensidad y el tiempo de tratamiento. Genes como el *rpoD*, *groEL*, *rpoH*, *cpsB*, *ostA* y *cpxP* mostraron sobreexpresión frente al tratamiento sub-inhibitorio, lo que indicaría una implicación en la resistencia bacteriana frente al carvacrol en estas condiciones. Por el contrario, otros genes no revelaron una activación, o incluso mostraron represión, como *rscF*, *degP*, *djlA*, *lon* y *cpxR*, descartando el desempeño de un papel importante en la respuesta frente al compuesto. Sin embargo, únicamente el gen *rpoH* mantuvo su activación frente al mismo antimicrobiano en tratamientos letales, reforzando la idea de que la RNA polimerasa relacionada con la respuesta a estreses en las envolturas celulares, es clave en los mecanismos de resistencia bacteriana al carvacrol. Estos resultados permitirán el diseño de estrategias de conservación más adecuadas y de forma más eficiente en la industria alimentaria.

Abstract

Currently, food poisoning is a major health issue in the European Union, being *Escherichia coli* one of the involved causative agents. The impact of foodborne outbreaks, together with the high food waste, requires an increase in the food shelf-life and assurance of the food safety. For this purpose, many efforts are aimed at developing preservation technologies, such as the use of natural antimicrobials. However, their use in the food industry is frequently limited. For this reason, it is important to better study these technologies for achieving more efficient food preservation, and assure the consumer's protection. The use of molecular tools for assessment of gene expression and identification of the mechanisms of bacterial resistance, such as the β -galactosidase assay, assists us for these studies. The final objective of this research was the use of this technique to evaluate the *E. coli* response to sub-inhibitory and lethal treatments by carvacrol.

Microbial responses to carvacrol varied as a function on the intensity of treatment. On the one hand, overexpression of *rpoD*, *groEL*, *rpoH*, *cpsB*, *ostA* and *cpxP* sub-inhibitory treatment was detected, indicating their involvement in bacterial resistance to carvacrol under these conditions. By contrast, *rcsF*, *degP*, *djlA*, *lon* and *cpxR* were not overexpressed, suggesting that these genes are not involved in the cell response to the compound. On the other hand, among those genes, only *rpoH* gene was overexpressed under lethal treatments, indicating the importance in the mechanisms of bacterial resistance of this RNA polymerase related to stresses in cell envelopes. These results will enable the design of more appropriate and efficient food preservation strategies in the food industry.

2. Introducción

A lo largo de estos últimos años se ha observado una disminución de la disponibilidad de alimentos. Mientras que la población mundial aumenta en número exponencialmente, y de igual forma la demanda de alimentos, su producción se ha quedado estancada o sufre un incremento insuficiente para satisfacer las necesidades nutricionales. La prevalencia de desnutrición todavía se prevé mayor para 2050. Según la Food and Agriculture Organization (FAO, 2011), se estima que la población mundial crezca desde 6.900 millones hasta los 9.200 millones de personas, lo que exigirá un aumento de la producción mundial de alimentos de mantenerse las tendencias actuales. Por esta razón, uno de los objetivos prioritarios en la actualidad es aumentar la producción de alimentos de forma eficiente y sostenible, y mejorar su distribución y conservación (Foresight, 2011).

El **desperdicio de los alimentos** es un gran impedimento para conseguir cubrir las necesidades nutricionales de la población. Se estima que en Reino Unido y EE.UU., entre un 30% y un 40% de los alimentos producidos se deterioraron o se desecharon a nivel doméstico en el año 2005 (Nellemann *et al.*, 2009).

Uno de los principales motivos de dicho desperdicio es la presencia y **proliferación de microorganismos alterantes**. Éstos provocan una pérdida de calidad en el alimento, y finalmente su putrefacción, ocasionando el rechazo por parte del consumidor. Como causantes del deterioro del alimento destacan las bacterias, debido a su ubicuidad y a su elevada velocidad de crecimiento.

Por otro lado, la seguridad alimentaria puede verse afectada por el **crecimiento de microorganismos patógenos** hasta niveles que causen la pérdida de inocuidad del alimento, cuyo consumo conllevaría un riesgo para la salud. Las toxioinfecciones alimentarias son una de las principales causas de atención sanitaria. En el año 2012 en la Unión Europea, se informó de un total de 5.363 brotes de origen alimentario, que occasionaron 55.453 casos, 5.118 hospitalizaciones y 41 muertes (EFSA y ECDC, 2014).

Una de las principales bacterias implicadas en toxioinfecciones alimentarias es *Escherichia coli*, bacteria Gram-negativa de origen fecal, cuya incidencia en todo el mundo se estima en más de 100 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2008). En el año

2012 en la Unión Europea, se confirmaron 5.671 casos de *E. coli* verotoxigénica (ECVT), con una tasa de notificación de 1,15 por 100.000 habitantes y una tasa de mortalidad de 0,36%, por ello, se encuentra entre los 8 primeros agentes causales de brotes toxíinfecciosos (EFSA y ECDC, 2014). Uno de los brotes alimentarios con mayor repercusión en los últimos años fue el causado por *E. coli* O104:H4, en Alemania. En este país, se notificaron 3.224 casos de infección asociados con el brote, con un total de 35 fallecidos (CNE, 2011). En el periodo de 2007-2012, exceptuando el año 2011 debido a este brote de Alemania, se ha observado una tendencia creciente en el número de casos confirmados de infecciones causadas por ECVT en la Unión Europea (EFSA y ECDC, 2014).

La estrategia empleada para incrementar la protección de los consumidores es la utilización de tecnologías de conservación de los alimentos. Bien se basan en la inhibición del crecimiento microbiano, evitando alcanzar concentraciones perjudiciales en el alimento, o bien en la inactivación microbiana para eliminar las células patógenas (Mañas y Pagán, 2005).

Uno de los métodos de conservación más ampliamente utilizados en la industria alimentaria son los conservantes químicos sintéticos. Sin embargo, existe cada vez un mayor rechazo social a estos antimicrobianos. Por ello, se está desarrollando el **empleo de conservantes de origen natural, tales como los aceites esenciales (AEs)** extraídos de plantas y de algunos de sus componentes mayoritarios de elevada eficacia antimicrobiana, como por ejemplo el carvacrol. No obstante, el uso efectivo de estos compuestos requiere un extenso conocimiento sobre sus mecanismos de inactivación microbiana.

En el ámbito de la microbiología de los alimentos, los estudios actuales persiguen, entre otros, **conocer y profundizar en los sistemas y mecanismos de actuación de las tecnologías y tratamientos sobre los microorganismos**. Los resultados de estas investigaciones permitirán el diseño y empleo de métodos de conservación más eficientes, aplicados de una manera más óptima. Para ello, es preciso poner a punto técnicas capaces de evaluar los mecanismos de inactivación, resistencia y adaptación microbiana frente a tales métodos de conservación.

Los AEs son líquidos aromáticos aceitosos que se obtienen de diferentes partes de las plantas como flores, brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutos, o raíces, y que a lo largo de la historia se han empleado para una amplia variedad de propósitos debido a sus múltiples propiedades (Hammer *et al.*, 1999; Jones, 1996). En particular, la actividad antimicrobiana de los aceites y extractos de las plantas ha constituido la base de muchas aplicaciones, incluyendo la conservación de alimentos crudos y procesados, productos farmacéuticos, medicina alternativa y terapias naturales (Lis-Balchin y Deans, 1997). Los aceites esenciales son compuestos volátiles, solubles en lípidos y disolventes orgánicos, y generalmente de menor densidad que el agua (Bakkali *et al.*, 2008). Muchos de ellos se encuentran clasificados como sustancias generalmente conocidas como seguras (GRAS, Generally Recognized as Safe en inglés) e incluso algunos de sus componentes están legalmente registrados como condimentos en Europa y Estados Unidos (Burt, 2004), de forma que su empleo está permitido en los alimentos y pueden ser utilizados como conservantes alimenticios.

Uno de los compuestos más investigados y empleados es el carvacrol (2-metil-5-(1-metiletil) fenol), un fenol monoterpoide (Figura 2.1) que proviene de la especias orégano y tomillo (Burt *et al.*, 2005). La mayoría de estudios evalúan la acción antimicrobiana de los AEs mediante la valoración individual de sus componentes, debido a que los AEs contienen muchos compuestos y en proporciones muy variables.

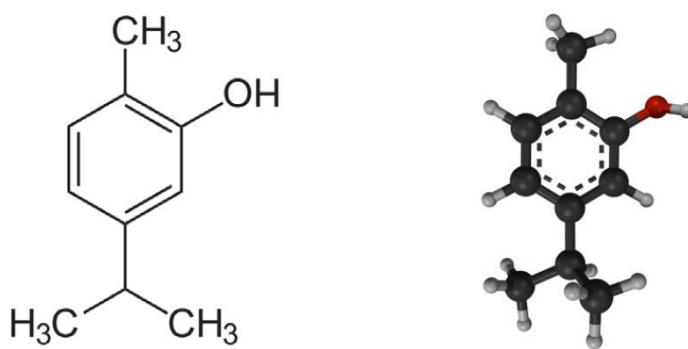


Figura 2.1. Estructura química del carvacrol (Dozal *et al.*, 2010).

Este compuesto provoca unos daños en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de los lipopolisacáridos al exterior e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert *et al.*, 2001). Se ha demostrado que **el carvacrol tiene una alta eficacia antimicrobiana contra *E.***

coli (Skandamis *et al.*, 2001). Una concentración de carvacrol a 1mM permite el crecimiento de *E. coli* pero sin la formación de flagelos, lo que supone una restricción de su movilidad; tratamientos en concentraciones más elevadas (5mM), provocan la muerte celular (Burt *et al.*, 2007).

Muchos estudios han demostrado que los **AEs y sus principales constituyentes poseen una elevada actividad antimicrobiana**, inhiben el metabolismo y el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras, e incluso pueden llegar a causar su muerte en pequeñas concentraciones (Somolinos *et al.*, 2012; Belletti *et al.*, 2004; Viuda *et al.*, 2008). No obstante, se ha observado que su efectividad varía en función de diversos factores (Ait-Ouazzou, 2012):

- ✓ **Factores del tratamiento:** el tipo de AE, su concentración y el tiempo son parámetros fundamentales en la acción antimicrobiana. Los AEs poseen diferentes mecanismo de actuación, y del tal forma, su efectividad depende de otros factores, como el microorganismo diana o propiedades del alimento. En términos generales, un incremento de la concentración del aceite y un aumento del tiempo de aplicación supone un mayor daño a la célula (Sandri *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2004).
- ✓ **Factores microbiológicos:** la resistencia frente a los AEs es distinta en base al tipo de microorganismo diana. Además, diversos estudios han demostrado que su concentración también influye de forma notable en la eficacia de los tratamientos de inactivación (Somolinos *et al.*, 2012).
- ✓ **Factores ambientales:** el pH es uno de los principales elementos que afecta a la actividad antimicrobiana de los AEs. Generalmente, un pH ácido incrementa el efecto antimicrobiano del tratamiento (Juven *et al.*, 1994; Burt, 2004). Otros de los factores ambientales detectados son la temperatura y composición del alimento. En términos generales las temperaturas bajas implementan la actividad de los aceites (Burt, 2004), y respecto a la composición del alimento, el contenido de grasa y la complejidad de los alimentos muestran un efecto neutralizador del AE (Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010).

En función de estos factores la aplicación de AEs puede provocar distintos efectos, desde ralentizar o inhibir el crecimiento microbiano, hasta una inactivación de la célula. De tal forma se podrían emplear en la industria alimentaria tanto como un sistema de conservación, su adición al producto en baja concentración de forma que inhibía la proliferación microbiana hasta su consumo, o bien como un método de inactivación, un tratamiento con una concentración más elevada que provoque la disminución de la carga microbiana del alimento.

Respecto a la acción antimicrobiana de los AEs, existen **múltiples mecanismos de actuación**, ya que en las células hay diferentes estructuras diana sensibles al tratamiento, y su acción puede producirse de forma independiente, simultanea o consecutiva. En parte, se debe a las numerosas moléculas con gran diversidad de grupos químicos que presentan (Espina *et al.*, 2011). Los objetivos de ataque de estos agentes antimicrobianos en la célula microbiana pueden ser (Davidson *et al.*, 2005):

- Envolturas celulares.
- Enzimas metabólicas.
- Síntesis de proteínas.
- Sistema genético.

Son puntos clave de la célula microbiana esenciales para el desarrollo y supervivencia de los microorganismos, que si son dañados pueden provocar su inactivación (Dorman y Deans, 2000; Skocibusic y Bezik, 2004; Burt *et al.*, 2007; Somolinos *et al.*, 2012).

En este sentido, muchos estudios han descrito las principales causas y mecanismos implicados en la inactivación microbiana por AEs:

- Deterioran varios **sistemas enzimáticos**, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales (Conner, 1993).
- Son capaces de unirse a las **proteínas de membrana celular** alterando su estructura y funcionalidad (Juven *et al.*, 1994).

- Se incorporan a los **lípidos de las envolturas celulares**, desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y otros contenidos celulares vitales y, finalmente, provocando la inactivación del microorganismo (Turgis *et al.*, 2009).
- Interaccionan directamente con las **ATPasas de la membrana citoplasmática** encargadas de la regulación del pH, inhibiendo su actividad (Burt, 2004).
- Provocan el **aumento de la concentración de peróxidos lipídicos**, tales como radicales hidroxilo o alcoxilo que provocan la muerte celular (Lucini *et al.*, 2006).

No obstante, el empleo de AEs tiene un gran inconveniente que limita considerablemente su uso en la industria alimentaria. Las dosis necesarias para ejercer un efecto antimicrobiano son suficientemente elevadas para causar la **alteración del aroma y del sabor del alimento** y provocar el rechazo por parte de los consumidores (Burt, 2004). Por tal razón, conocer sus mecanismos de acción es muy importante, ya que podría permitir su empleo de forma más eficiente, en dosis más reducidas y sin que conlleve la modificación de las propiedades sensoriales del producto.

Muchos estudios profundizan en el empleo de AEs a fin de evaluar su actividad y conseguir optimizar su eficacia, e incluso, optan por la combinación con otras tecnologías de conservación de los alimentos en búsqueda de efectos sinérgicos que reduzcan la dosis de aplicación (Espina *et al.*, 2011). El hecho de que algunos de estos AEs puedan causar daños subletales en las envolturas celulares, resulta de especial interés por las posibilidades que ofrece en el diseño de procesos combinados junto con tecnologías como el calor, debido al efecto sinérgico que presentan cuando se aplican simultáneamente (Somolinos *et al.*, 2012). Sin embargo, los conocimientos de los que actualmente se dispone todavía son escasos, se desconoce la regulación de muchos genes y el estudio frente a tratamientos de inactivación es un ámbito poco conocido.

En los últimos años, las ciencias biológicas han experimentado un gran avance debido al desarrollo de técnicas, relativamente rápidas, que han permitido la secuenciación de genomas de una gran cantidad de seres vivos. El conocimiento de las secuencias genómicas de los microorganismos han posibilitado su aislamiento, caracterización y manipulación, permitiendo el diseño y creación de mutantes. De tal

forma, estas herramientas han supuesto un gran progreso en la realización de investigaciones genéticas. *E. coli* es una de las especies bacterianas más estudiadas, ya que se emplea como uno de los microorganismos de referencia de estudio en bacterias Gram-negativas.

El empleo de estas herramientas moleculares nos ofrece la posibilidad de realizar un estudio más detallado de los mecanismos de inactivación. Uno de los estudios más interesantes es la cuantificación de la expresión de genes y proteínas que permite evaluar la expresión génica y su implicación en la resistencia microbiana. Por ejemplo, mediante el **empleo de fusiones transcripcionales** (Serebriiskii y Golemis, 2000), construcciones genéticas formadas por el promotor del gen de interés del estudio junto a un gen reportero (Figura 2.2) que se introducen en el genoma de la célula (Fried et al., 2012). Se denomina gen reportero, al gen estructural codificante de una proteína cuya síntesis pueda ser cuantificada de forma sencilla, y de tal forma, que permita medir la actividad transcripcional de los promotores con objeto de inferir la regulación del gen en estudio. **La determinación de las situaciones bajo las que se activa o inhibe un gen frente a un tratamiento de conservación, permitiría evaluar su influencia en la resistencia microbiana frente al estrés sometido.**

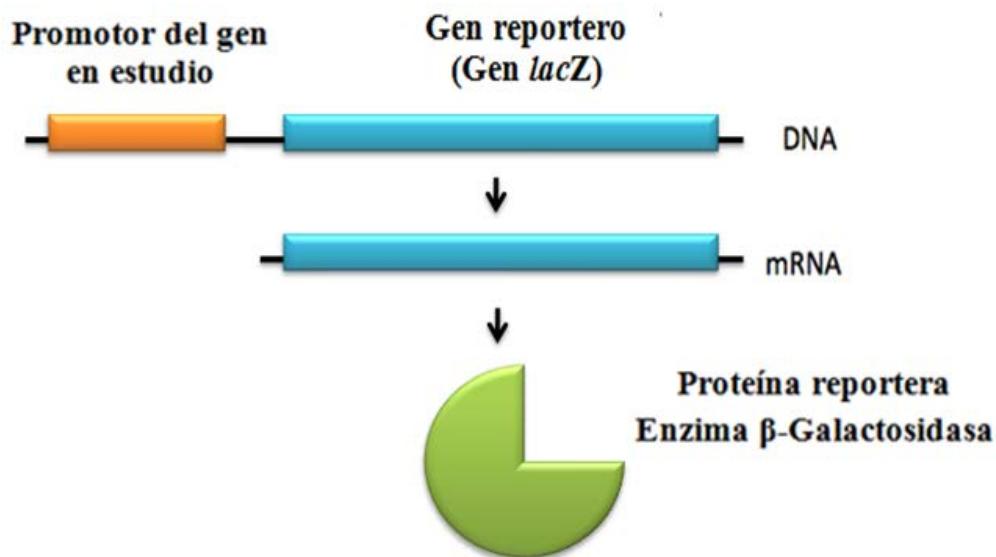


Figura 2.2. Fusión transcripcional del gen *lacZ*, como gen reportero, junto al promotor del gen de interés para la evaluación de su expresión.

Existen muchos genes reporteros empleados en el estudio de la regulación génica. Algunos de ellos, como el gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein en inglés), se basan en la síntesis de una proteína que es capaz de emitir fluorescencia cuando es estimulada (Southward y Surette, 2002). En otros genes reporteros, la traducción del gen da lugar a un enzima, como es el caso del enzima β -galactosidasa (β -Gal) codificado por el **gen lacZ**. Para su evaluación, es preciso llevar a cabo un ensayo enzimático que permita cuantificar la actividad del enzima sintetizado, y que por lo tanto, será proporcional a la expresión del gen (Miller, 1972; Griffith y Wolf, 2002).

El **ensayo de la actividad β -galactosidasa** es una de las técnicas más empleadas para la evaluación de la expresión génica, especialmente en algunos microorganismos como *E. coli* (Serebriiskii y Golemis, 2000). En primer lugar, se procede a la extracción del enzima del interior celular mediante la permeabilización de la membrana microbiana. Posteriormente, se incuba con un sustrato cuyo producto resultante posea propiedades mesurables, como puede ser el color. Uno de los más empleados es el ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -galactoside), un sustrato incoloro que, hidrolizado por la β -Gal, da lugar a galactosa y a ONP (ortho-Nitrophenol) (Figura 2.3). El ONP posee una coloración amarilla, cuya concentración puede ser determinada mediante la medición de la absorbancia a 420 nm. De tal forma, una señal elevada de absorbancia indicaría una elevada actividad enzimática, y por lo tanto, también una elevada expresión génica (Miller, 1972).

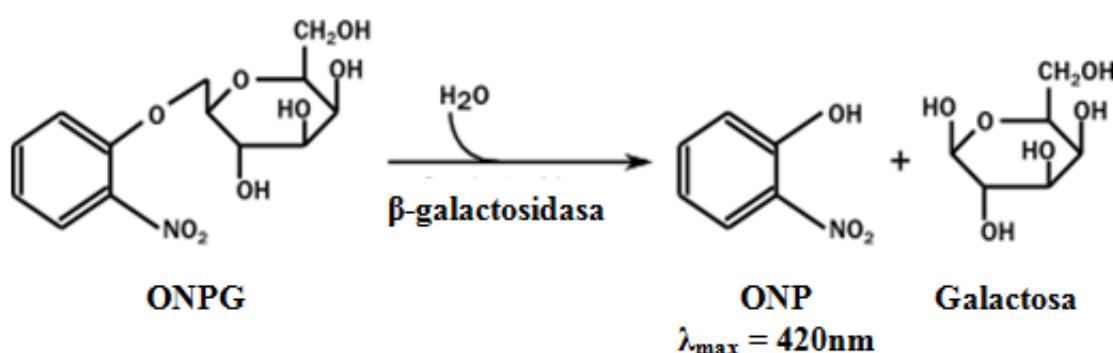


Figura 2.3. Hidrólisis enzimática del ONPG en ONP y galactosa regulada por el enzima β -galactosidasa (Held, 2007).

3. Justificación y Objetivos

Como se ha mencionado anteriormente, las ciencias biológicas han experimentado un gran avance debido al desarrollo de técnicas, relativamente rápidas, que han permitido la secuenciación de genomas de una gran cantidad de seres vivos. El empleo de estas herramientas moleculares nos ofrece la posibilidad de realizar un estudio más detallado de los mecanismos de inactivación. Uno de los estudios más interesantes es la cuantificación de la expresión de genes y proteínas que permite evaluar la expresión génica y su implicación en la resistencia microbiana, por ejemplo, mediante el **empleo de fusiones transcripcionales**. Entre estas técnicas, el **ensayo de la actividad β -galactosidasa** ha sido uno de los métodos más estudiados para la evaluación de la expresión génica. Si bien esta técnica está siendo sustituida por otros métodos más sensibles y rápidos como la qPCR, continúa siendo una técnica frecuentemente utilizada en la actualidad debido a su simplicidad y bajo precio. Su empleo puede permitir evaluar el nivel de expresión de un determinado gen en determinadas situaciones, como el tratamiento bacteriano con el antimicrobiano natural carvacrol. Por ello, el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado persigue los siguientes objetivos:

1º Objetivo. Puesta a punto de la metodología para la evaluación de la expresión génica de *Escherichia coli* frente a tratamientos sub-inhibitorios de carvacrol mediante el ensayo de la actividad β -galactosidasa.

- a. Establecimiento de los parámetros del tratamiento sub-inhibitorio con carvacrol.
- b. Evaluación de la expresión de los genes de interés en el estudio.

2º Objetivo. Evaluación de la respuesta de *Escherichia coli* frente a tratamientos letales de carvacrol.

- a. Establecimiento de los parámetros de tratamiento de inactivación con carvacrol en función de la inactivación y el daño subletal provocados.
- b. Evaluación de la expresión génica mediante el ensayo de la actividad β -galactosidasa.

Además de perseguir la consecución de estos objetivos técnicos, el objeto de este proyecto es el aprendizaje y la profundización en el campo científico. A lo largo de la realización del grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, he participado en varios proyectos, uno de ellos comprendido en la beca de colaboración denominada “Estudio de la respuesta microbiana frente a diferentes métodos de conservación de los alimentos”, y otro en colaboración con una empresa de la industria agroalimentaria, bajo el proyecto titulado “Influencia de la velocidad de congelación sobre la capacidad de retención de agua de lomo de cerdo”. Estos estudios me han permitido conocer distintos perfiles de trabajo, adquirir diversas competencias y ahondar en distintos campos de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. De entre ellos y, sin lugar a duda, me resultó más atractivo, enriquecedor e interesante el ámbito de la investigación, y por esta razón, opté por el desarrollo y defensa de un Trabajo Fin de Grado en este perfil profesional.

La realización de este Trabajo Fin de Grado se encuentra vinculado a uno de los perfiles profesionales de la titulación: Docencia e Investigación en el ámbito alimentario. Este proyecto se incluye dentro de la línea de investigación “Aproximación molecular al mecanismo de inactivación y resistencia microbiana y su aplicación al diseño de procesos combinados de conservación de los alimentos” en el grupo de “Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos”, al que pertenecen los directores del presente trabajo, Dr. Rafael Pagán, y Dr. Diego García.

4. Metodología

4.1. Microorganismos y medios de cultivo.

El microorganismo estudiado fue *Escherichia coli* MC4100, y la colección de mutantes con fusiones transcripcionales de esta cepa (Tabla 4.1), cedidas por el laboratorio del Profesor Kelley de la University Hospital and Medical School de Ginebra (Suiza).

Tabla 4.1. Cepas empleadas en el estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente, referencia	Nomenclatura en el estudio
MC4100	Cepa parental	Colección laboratorio	
MC4100	$\phi\lambda R545$ inm ²¹	Kelley, W.L.	Control negativo
MC4100	$\phi(rpoDp-lacZ)\lambda pF13$	Yano, 1997	<i>rpoD</i> ₁
MC4100	$\phi(rpoDp-lacZ)\lambda R545$	Raina,S.	<i>rpoD</i> ₂
MC4100	$\phi(groELp-lacZ)\lambda pF13$	Yano, 1997	<i>groEL</i> ₁
MC4100	$\phi(groELp-lacZ)\lambda R545$	Raina,S.	<i>groEL</i> ₂
MC4100	<i>rcsFp-lacZ-kanP1</i> from FG120	Drapeau, G.	<i>rcsF</i>
MC4100	$\phi(degP-lacZ)\lambda pR588$	Phillips, 1990	<i>degP</i>
MC4100	$\phi(rpoHP3-lacZ)\lambda R545$	Phillips, 1990	<i>rpoH</i>
MC4100	<i>cpsB10-lac-inminm</i> ^λ	Gottesman, S.	<i>cpsB</i>
MC4100	$\phi(djlAp-(HincII-RV)-lacZ)\lambda R545$	Kelley, 1997	<i>djlA</i> ₁
MC4100	$\phi(djlAp-Pst-Stu-lacZ)\lambda R545$	Kelley, 1997	<i>djlA</i> ₂
MC4100	$\phi(djlAp-HaeIII RV-lacZ)\lambda R545$	Kelley, 1997	<i>djlA</i> ₃
MC4100	$\phi(ostAp-(HincII-RV-lacZ)\lambda R545$	Kelley, W.L.	<i>ostA</i> ₁
MC4100	$\phi(ostAp-HaeIII RV-lacZ)\lambda R545$	Kelley, W.L.	<i>ostA</i> ₂
MC4100	$\phi(Ionp-lacZ)$	Kelley, W.L.	<i>lon</i>
MC4100	<i>cpxPp-lacZ(pAD282)</i>	Kelley, W.L.	<i>cpxP</i>
MC4100	<i>cpxRp-lacZ(pAD279)</i>	Kelley, W.L.	<i>cpxR</i>

Las cepas se conservaron en crioviales (Maintenance Freeze Medium 064-TA0124, Scharlau Chemie, Barcelona, España) con glicerol a una temperatura de -80°C. A partir de los crioviales, se realizaron siembras por agotamiento en estría semanalmente en placas de agar tripticasa soja al 4% p/v (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) con extracto de levadura al 0,6% p/v (Oxoid) estériles (TSA-EL) que se incubaron 24 h/37°C en estufa estática (Incubig, Selecta, Barcelona, España).

Tras comprobar la uniformidad de las colonias en placa para descartar una posible contaminación, se prepararon precultivos con la inoculación de colonias aisladas en 5 mL de caldo Luria Broth al 3,5% p/v (Sigma Aldrich, Milán, Italia) estéril (LB) en tubos de ensayo y se incubaron 12 h/ 37°C en estufa de aire forzado (HotcoldUL, Selecta) en agitación continua a 130 rpm (Rotabit, Selecta).

Para la obtención de suspensiones en fase estacionaria, se determinó la concentración celular mediante recuento microscópico (L-Kc, Nikon, NipponkogakuKK, Japón) en cámara de Thoma, y se calculó el volumen de inóculo a adicionar en frascos de vidrio con 50 mL de TSB-EL estéril necesario para conseguir una concentración inicial de 10^6 UFC/mL. Estos cultivos se incubaron 24 h/ 37°C/ 130 rpm para alcanzar la fase estacionaria, con una concentración microbiana de 2×10^9 UCF/mL comprobada por recuento microscópico (Figura 4.1).

Para la obtención de una suspensión en fase exponencial, se inocularon 100 μ L del precultivo en 5 mL de LB estéril y se incubaron durante 3-4 h/ 37°C/ 130 rpm hasta alcanzar un densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) de 0,6 aproximadamente (Figura 4.1).

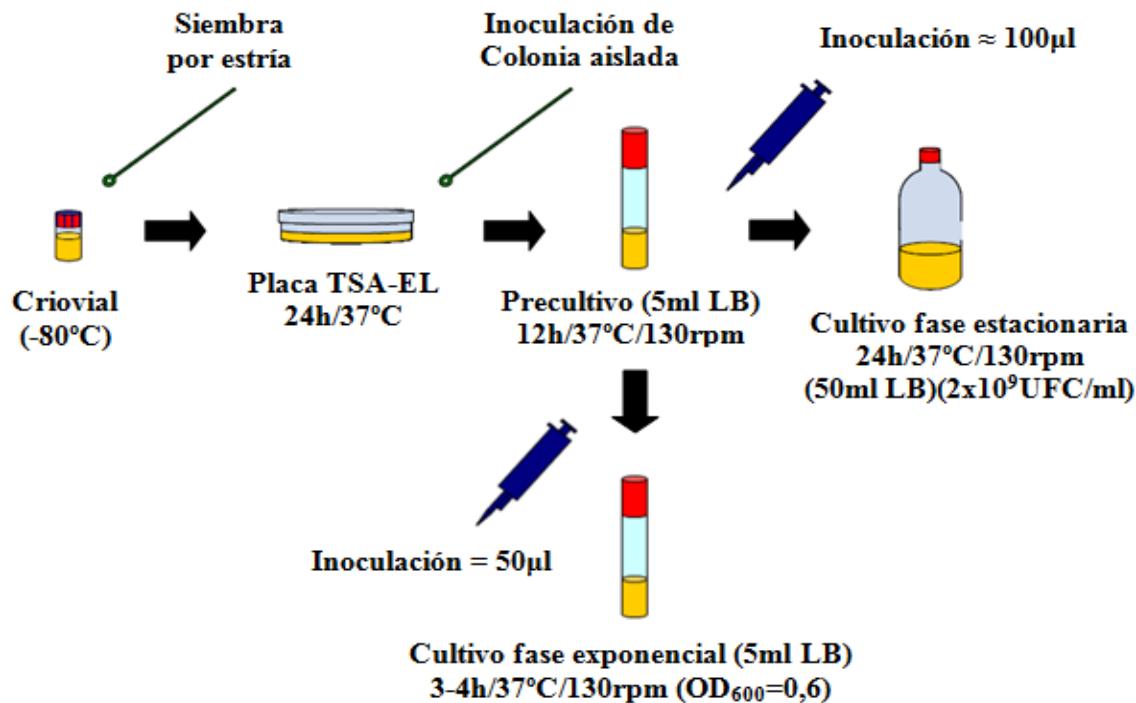


Figura 4.1. Metodología para la obtención de suspensiones en fase estacionaria y en fase exponencial (Cebrián, 2009).

4.2. Tratamientos de carvacrol sub-inhibitorios.

Para llevar a cabo la evaluación de la expresión génica frente a tratamientos sub-inhibitorios, es decir a las concentraciones más elevadas que no impidan el crecimiento microbiano, fue preciso determinar primero la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se denomina así a la concentración más reducida de un compuesto con propiedades antimicrobianas, capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo en unas determinadas condiciones.

Su determinación se basó en la inoculación de 0,5 µL de cultivo estacionario de la cepa *E. coli* MC4100 parental, en tubos de ensayo con 5 mL de LB estéril y carvacrol (Sigma Aldrich) en distintas concentraciones: 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. Los AEs y sus componentes son prácticamente inmiscibles en agua. Por ello, se sugiere la utilización de detergentes tales como Tween 20 y 80 para su aplicación, pero su uso puede reducir el efecto antimicrobiano de estos compuestos y/o dañar las envolturas celulares microbianas (Burt, 2004). En este estudio, se decidió evitar el uso de estas sustancias, y en su lugar, se utilizó otro procedimiento que consistió en añadir los AEs al medio de tratamiento y agitar la mezcla vigorosamente durante 2 min en un agitador de tubos (Friedman *et al.*, 2002). Inmediatamente, los tubos inoculados se incubaron 24 h/ 37°C/ 130 rpm en estufa de aire forzado. El tubo de ensayo con la menor concentración que no mostrase turbidez, indicaría que no se ha producido en él crecimiento microbiano, por lo que, se establecería como CMI.

El tratamiento sub-inhibitorio se realizó en medio nutritivo LB con la mitad de la CMI ($\frac{1}{2}$ CMI) de carvacrol, de forma que permitiese su crecimiento, y a la vez, posibilitase la expresión génica como respuesta a los compuestos antimicrobianos. Se inoculó 50 µL de un precultivo en 5 mL de LB estéril con $\frac{1}{2}$ CMI de carvacrol, se mezcló mediante un mezclador de vórtice (Ikavortex 3, Genius, Königswinter, Alemania) y se incubó hasta obtener una suspensión en fase exponencial tal y como se detalla en el punto 4.1.

4.3. Tratamiento de inactivación con carvacrol.

Para evaluar la expresión génica frente a tratamientos de inactivación, fue necesario en primer lugar establecer las condiciones de tratamiento. El tiempo de duración del tratamiento se estableció en 10 minutos, suficiente para desarrollar la respuesta de resistencia de la bacteria, con el fin de poder comparar resultados con otros estudios de transcriptómica de nuestro grupo de investigación actualmente en desarrollo que también emplean esta duración (Chueca *et al.*, 2015). Por otro lado, se seleccionaron unas condiciones de tratamiento que causasen la inactivación de menos del 50% de la población y dañasen subletalmente a la mayor proporción de supervivientes posible, con objeto de definir unas condiciones letales en las que la mayoría de las células estuvieran vivas aunque afectadas por el compuesto para poder desarrollar una respuesta transcriptómica.

En primer lugar, con el objetivo de evaluar el daño subletal producido a la célula por los tratamientos de carvacrol, fue preciso calcular la Concentración Máxima No Inhibitoria (CMNI) del agente selectivo seleccionado. La CMNI se define como la concentración más elevada de un agente selectivo en un medio de cultivo, que provoca un descenso en el recuento inferior a un 20% respecto al mismo medio en ausencia del agente. Para este estudio, se determinó la CMNI de cloruro sódico (NaCl) y de sales biliares (SB). El procedimiento consistió en la siembra de la cepa *E. coli* MC4100 en TSA-EL, por un lado, con concentraciones de NaCl (Panreac, Barcelona, España) desde 0% hasta un 6%, en intervalos de 1%; y por otro lado, con concentraciones de SB (Biolife, Milán, Italia) desde 0% hasta 0,30%, en intervalos de 0,05%. El empleo de medios de cultivo selectivos como medio recuperación requirió un periodo de incubación más prolongado: 48 h/ 37°C.

En segundo lugar, para establecer la concentración adecuada de carvacrol para estudiar la inactivación y el daño subletal causado, se centrifugó 1 mL de cultivo estacionario (10.000 rpm/ 5 min) en microcentrífuga (Mini Spin, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se resuspendió en tampón fosfato salino (Sigma Aldrich). Posteriormente, esta suspensión se diluyó hasta una concentración de 3×10^8 UFC/mL, para ser tratada en tampón citrato-fosfato de pH 4,0 con concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ppm de carvacrol durante 10 minutos. Esta concentración microbiana inicial fue determinada previamente para conseguir una señal suficiente en la evaluación de la

expresión génica. Las muestras se incubaron 24 h/ 37°C en medio no selectivo (TSA-EL) y 48 h/ 37°C en medio selectivo con la CMNI correspondiente de cloruro sódico (TSAEL-NaCl) y de sales biliares (TSAEL-SB).

El recuento de los supervivientes se realizó mediante un contador automático de colonias por análisis de imagen (Analytical Measuring Systems, Protos, Cambridge, Gran Bretaña) en ambos medios en el rango de recuento comprendido entre 30 y 30.000 UFC/placa. Los resultados se reflejaron como unidades formadoras de colonia en unidades logarítmicas en los distintos medios de cultivo y frente a las distintas concentraciones de carvacrol.

La inactivación se calculó como la variación de recuento de supervivientes obtenidos en medio no selectivo a tiempo 0 y a tiempo 10 de tratamiento. Las células dañadas subletalmente tras los tratamientos se estimaron a partir de la diferencia entre el número de supervivientes obtenidos tras el tratamiento y siembra en un medio no selectivo y otro selectivo. Dependiendo del tipo de daño a evaluar, la diferencia con respecto al medio selectivo con NaCl permitía evaluar los daños subletales en la membrana citoplasmática, o con SB, para evaluar los daños subletales en la membrana externa (Mackey, 2000).

4.4. Ensayo de la actividad β -Galactosidasa.

Para cuantificar la expresión de los genes, se realizó el ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa (Miller, 1972). De acuerdo con este protocolo de ensayo, tras aplicar el tratamiento oportuno, se detuvo la síntesis proteica mediante la adición de cloranfenicol (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), se centrifugaron 1,5 mL del cultivo (6.000 rpm/ 6 min), se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el mismo volumen de un tampón estabilizante, Z-buffer con β -mercaptoetanol (0,05M; Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). El Z-buffer está compuesto por los siguientes reactivos (Panreac): Na_2HPO_4 (0,06M), NaH_2PO_4 (0,04M), KCl (0,01M) y MgSO_4 (0,001M).

En el caso de los tratamientos letales, para detener la síntesis proteica, se sustituyó la adición de cloranfenicol por la inmersión de cultivo en agua y hielo, ya que se observó una baja señal probablemente debido a la pérdida de enzima como consecuencia de la permeabilización de las envolturas celulares por el carvacrol (datos no mostrados).

Posteriormente se midió su absorbancia a longitud de onda de 600 nm (OD_{600}) y se realizaron diluciones en las cepas que mostraron más actividad enzimática, para obtener valores en el rango de trabajo (0,3-0,8).

A continuación, se permeabilizaron las células mediante la adición de cloroformo (70 μ L/mL; Panreac) y de SDS (0,035 μ g/mL; Panreac) para la extracción de la enzima β -galactosidasa. Sobre esta muestra se añadió el sustrato de la enzima β -galactosidasa, ONPG (Sigma Aldrich) a una concentración de 0,6 mg/mL, y se incubó a 30°C durante 20 minutos. Finalmente, se adicionó Na_2CO_3 (0,25M; Panreac) para detener la reacción, se centrifugó (14.500 rpm/ 5 min) para separar el cloroformo y evitar su interferencia en la medida, y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 420 nm y 550 nm.

A partir de estas medidas se calcularon las unidades Miller, que son un reflejo de la cantidad de enzima presente en la muestra, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades Miller} = (OD_{420} - 1,75 \cdot OD_{550}) \cdot 1000 / (OD_{600} \cdot min \cdot mL)$$

Donde OD_{420} es la absorbancia de la muestra a 420 nm; OD_{550} es la absorbancia de la muestra a 550 nm; OD_{600} es la absorbancia del cultivo a 600 nm; *min* es el tiempo de reacción (fijado en 20 minutos en este ensayo); y *mL* es el volumen de reacción en este experimento (mL).

Los resultados se reflejaron como el ratio de la actividad enzimática de las cepas tratadas con carvacrol sobre estas mismas cepas sin tratamiento, expresadas en logaritmo de base 2 (\log_2). Como control negativo se utilizó la cepa MC4100 sin gen de β -galactosidasa, $\varphi\lambda R545$ imm²¹, y como controles positivos se utilizaron las cepas con las construcciones $\varphi(prpoD-lacZ)\lambda pF13$ y $\varphi(prpoD-lacZ)\lambda R545$, ya que el factor de transcripción *rpoD* se expresa constitutivamente en fase exponencial.

4.5. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando suspensiones obtenidas en diferentes días. Las barras de error en las figuras indican las desviaciones estándar de la media para los puntos obtenidos en esos tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos fueron representados y sometidos a un análisis estadístico utilizando el programa GraphPadPrism® 5.00 (GraphPad Software, Inc., California, EE.UU.). Este programa se utilizó para determinar los promedios, las desviaciones estándar y realizar el análisis de varianza (ANOVA) con el test *post-hoc* Tukey para la comparación de las medias. Las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0,05$.

5. Resultados y Discusión

5.1. Respuestabacteriana frente a tratamientos sub-inhibitorios.

Como primer paso de esta investigación se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa parental. Como se observa en la figura 5.1, los únicos tubos de cultivo que mostraron turbidez tras su incubación fueron los medios con concentraciones de carvacrol a 10 y 50 ppm. Esto significa que en ambos tubos, pese a la presencia de carvacrol, la bacteria pudo multiplicarse en el medio de cultivo. Sin embargo, en concentraciones superiores de carvacrol no se observó turbidez, lo que indica que 100 ppm es una concentración suficientemente elevada como para inhibir su crecimiento. La presencia o ausencia de turbidez no indica la inactivación de la bacteria, únicamente refleja su capacidad de desarrollarse y crecer en el medio de cultivo.



Figura 5.1. Cultivos inoculados, e incubados (24 h/ 37°C/ 130 rpm), con la cepa *E. coli* MC4100 parental en LB con carvacrol en concentraciones de 10, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm (orden de izquierda a derecha).

De tal forma, se estableció 100 ppm como CMI, la concentración de carvacrol más baja que no mostró turbidez en el cultivo. No obstante, puesto que el objetivo es la evaluación de expresión génica frente a un tratamiento sub-inhibitorio, la concentración del antimicrobiano a ensayar debe permitir el crecimiento bacteriano, pero a la vez, ser capaz de provocar un estrés en la célula para que ésta ponga en marcha sus mecanismos de resistencia. Por tal razón, se estableció como parámetro para el **tratamiento 50 ppm, la mitad de la CMI (½ CMI; Gutiérrez *et al.*, 2013)**, para el estudio de expresión génica.

Una vez puesta a punto la metodología del ensayo de la β -galactosidasa, se evaluó el nivel de expresión de diferentes genes **relacionados con la adaptación al estrés** (*rpoD*, *groEL*, *rcsF*, *degP*, *rpoH*, *cpsB*, *djlA*, *ostA*, *lon*, *cpxP* y *cpxR*) frente al tratamiento sub-inhibitorio con carvacrol, con objeto de determinar su posible papel en la resistencia bacteriana frente a este antimicrobiano. Se emplearon las cepas disponibles en el laboratorio que poseían las fusiones transcripcionales del gen en estudio. En el caso de algunos genes, existía más de una cepa posible para determinar su expresión, con diferentes construcciones genéticas para evaluar la transcripción del mismo gen. Así, para su selección, se evaluó la regulación del mismo gen en las distintas cepas para determinar la existencia o no de variaciones en función de la fusión transcripcional.

El gen *rpoD* es un gen constitutivo codificante del factor sigma 70 (σ^{70}), RNA polimerasa, que está implicado en la crecimiento celular, y por ello, se sobreexpresa durante la fase de crecimiento exponencial de la bacteria (Maciag *et al.*, 2011). Otro gen del estudio es el *groEL*, que codifica una chaperona implicada en el plegamiento de nuevas proteínas (Horwich *et al.*, 1993). El gen *rcsF* codifica una lipoproteína de la membrana externa que interviene en la transducción de señales externas (Castanié-Cornet *et al.*, 2006). La transcripción y traducción del gen *degP* da lugar a una serina proteasa periplásmica, cuya función es degradar proteínas anómalas como pueden ser proteínas mutadas, dañadas por oxidación o agregadas, necesaria para la supervivencia a altas temperaturas (Strauch *et al.*, 1989). El gen *rpoH* codifica el factor sigma 32 (σ^{32}), implicado en el control de la respuesta de choque térmico durante la fase de crecimiento exponencial. Además, se ha demostrado que σ^{32} es responsable de la respuesta genética frente a otros agentes externos, como puede ser el etanol, cambios de pH alcalinos o choques hiperosmóticos (Van Bogelen *et al.*, 1987; Taglicht *et al.*, 1987; Bianchi y Banexy, 1999). El gen *djlA* codifica una co-chaperona involucrada en la regulación de la síntesis de la cápsula, cuya expresión aumenta frente a choques fríos (Kelley y Georgopoulos, 1997). El gen *cpsB* está implicado en la biosíntesis de un polisacárido capsular, cuya expresión aumenta frente a choques osmóticos (Trisler y Gottesman, 1984; Sledjeski y Gottesman, 1996). Otros de los genes estudiados fue el gen *ostA*, que codifica una proteína de transporte de lipopolisacáridos en la membrana externa relacionada con la tolerancia a solvente orgánicos (Wu *et al.*, 2006; Aono *et al.*, 1994), y el gen *cpxP*, que codifica una chaperona estimulada por estreses en las envolturas

celulares (DiGiuseppe y Silhavy, 2003). También se evaluó la expresión del gen *lon*, que codifica una proteasa responsable de la degradación de las proteínas mal plegadas (Laskowska *et al.*, 1996). Finalmente se determinó la activación el gen *cpxR*, que codifica un activador de la respuesta al estrés en las envolturas celulares (Batchelor *et al.*, 2005),

Los primeros resultados obtenidos revelaron que las cepas que poseían **construcciones transcripcionales del mismo gen, no mostraron diferencias significativas en su expresión génica** (Figura 5.2). Esto permitió reducir el número de cepas empleadas en la continuación del estudio, y seleccionar aquellos mutantes con fusiones transcripcionales que mejor respondieron al experimento y que mostraron una desviación estándar menor.

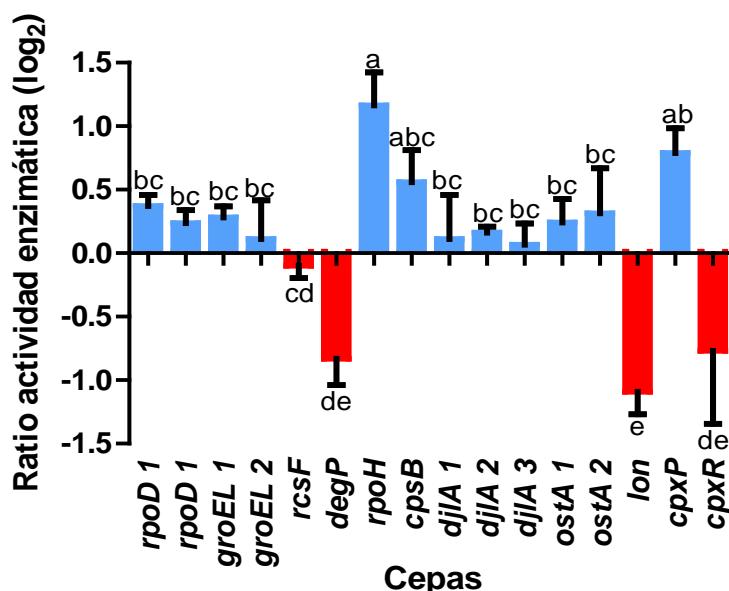


Figura 5.2. Evaluación de la expresión génica mediante el ratio de la actividad enzimática de la β -galactosidasa entre las células crecidas en presencia de carvacrol (50 ppm) y las crecidas en su ausencia, expresado en \log_2 . Se muestra la media y la desviación estándar de tres réplicas de las diferentes cepas de estudio, que reflejan sobreexpresión (■) o represión (■). Los resultados con la misma letra no muestran diferencia significativa, $p \leq 0,05$.

De este modo, las **cepas seleccionadas para evaluar la expresión génica** y para continuar con el estudio frente a tratamientos de inactivación fueron: *rpoD*₁, *GroEL*₁, *rcsF*, *degP*, *rpoH*, *cpsB*, *djlA*₂, *ostA*₁, *lon*, *cpxP* y *cpxR*. Estas cepas se seleccionaron ya que fueron las que mostraron una menor variabilidad entre las diferentes medidas del ensayo de la β -galactosidasa.

Puesto que el tratamiento se aplicó en una fase de crecimiento exponencial, el gen *rpoD* mostró una elevada actividad. Sin embargo, en la figura 5.2 se observa que **en presencia del carvacrol todavía fue superior la expresión del gen *rpoD* (2 veces superior a las células no tratadas)**, pudiendo estar también relacionada su sobreexpresión con la resistencia microbiana frente al carvacrol. Uno de los genes que mostró una **leve sobreexpresión frente al carvacrol fue el gen *groEL***, pudiendo estar involucrado en la resistencia bacteriana mediante el plegamiento de algunas proteínas. No obstante, por el hecho de presentar una menor sobreexpresión, no se podría concluir que su implicación en la resistencia fuera menor, puesto que se desconoce cómo esta expresión génica se traduce en la respuesta de la bacteria. Por el contrario, aunque el **gen *rcsF*** está implicado en la transducción de señales externas, **no se observó una variación relevante de su expresión** frente al tratamiento sub-inhibitorio de carvacrol, al igual que el **gen *djlA***. Los resultados obtenidos reflejan una sobreexpresión del gen *rpoH* elevada frente al constituyente habitual de aceites esenciales. La actividad enzimática de las células tratadas fue más del doble de las no tratadas, lo que indicaría que este gen **se encuentra implicado también en la resistencia microbiana frente a tratamientos de carvacrol sub-inhibitorios**. Los resultados reflejaron una sobreexpresión del gen *cpsB*, que apuntaría a las envolturas celulares como uno de los objetivos de este compuesto, y por lo tanto la respuesta de la bacteria podría requerir de la síntesis del polisacárido capsular. **Los genes *ostA* y *cpxP*** reflejaron un aumento de la expresión en presencia del carvacrol, por lo que ambos genes **podrían estar involucrados en los mecanismos de resistencia de la bacteria, a nivel de las envolturas celulares**.

El estudio de la expresión génica de los **genes *degP*, *lon* y *cpxR*, no reveló su sobreexpresión frente al carvacrol (actividad reducida a la mitad respecto a las células no tratadas)**, lo que descartaría su participación en la respuesta de la bacteria frente al carvacrol.

De tal forma, se evidenciaron los genes sobreexpresados y reprimidos por el tratamiento sub-inhibitorio con el antimicrobiano carvacrol (Figura 5.2), apuntando a aquellos genes implicados en la resistencia microbiana frente a este compuesto antimicrobiano.

5.2. Respuesta bacteriana frente a tratamientos de inactivación.

Una vez puesta a punto la metodología de evaluación de la expresión génica, y ensayada frente a tratamientos sub-inhibitorios, se planteó evaluar la utilidad de esta técnica frente a tratamientos de inactivación microbiana, para los que hasta ahora no se habría empleado.

La dificultad de la utilización de este tipo de ensayos frente a tratamientos de inactivación microbiana reside en que se han de definir unas condiciones de tratamiento tales que causen cierta inactivación en una parte de la población microbiana, con objeto de verificar que los microorganismos se encuentran sometidos a un estrés letal, pero que al mismo tiempo, permitan la supervivencia de una parte significativa de la población para poder detectar su respuesta. Es decir, si la mayoría de la población muere rápidamente a consecuencia del tratamiento, no podría desarrollar una respuesta transcriptómica y, en consecuencia, no se revelarían diferencias en la expresión génica entre las células nativas y las tratadas. Conviene además verificar que esos microorganismos supervivientes también se han visto de algún modo afectados por el tratamiento inactivante. Para ello, en este estudio planteamos la determinación de la presencia de daños subletales en las envolturas celulares. Las envolturas celulares son habitualmente las primeras estructuras que se ven afectadas por estos tratamientos. Si la intensidad del tratamiento cesa y las condiciones de recuperación son las adecuadas, los microorganismos pueden lograr su reparación, sobreviviendo de este modo al tratamiento. La detección de una gran proporción de células dañadas subletalmente indicaría que el tratamiento letal está afectando a un gran número de supervivientes, que podrían desarrollar una respuesta mediante la expresión de genes involucrados en la resistencia frente al tratamiento.

Para evaluar la presencia de células dañadas subletalmente tras los tratamientos de carvacrol, fue preciso determinar previamente la CMNI de los agentes selectivos: cloruro sódico y sales biliares.

En la figura 5.3, se muestran los recuentos microbianos en función de la concentración de cloruro sódico en el medio de cultivo.

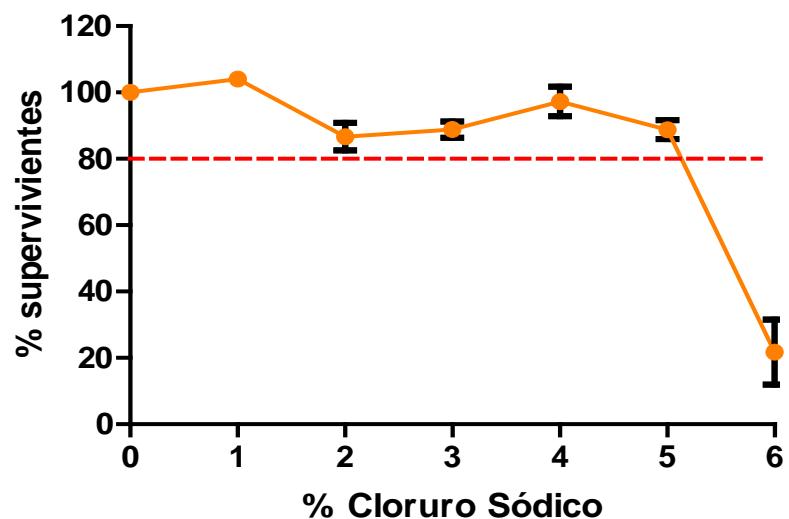


Figura 5.3. Recuento de células en medio selectivo, TSA-EL con distintas concentraciones de cloruro sódico, expresado en porcentaje respecto al recuento en medio no selectivo (TSA-EL). La línea roja discontinua indica el límite de recuento mínimo para la determinación de la CMNI. Se muestra la media y la desviación estándar de tres réplicas.

Como se muestra en la figura 5.3, el recuento en medio selectivo con concentraciones de cloruro sódico hasta el 5% p/v descendió ligeramente, permaneciendo en valores superiores al 80% respecto al medio no selectivo. Sin embargo, a una concentración del 6% p/v de cloruro sódico, el recuento disminuyó hasta valores del 20%, y por tal razón, se estableció **el 5% como CMNI de cloruro sódico** para la cepa *E. coli* MC4100. Esta concentración de NaCl fue empleada para la evaluación del daño subletal provocado en la membrana citoplasmática por el carvacrol.

Por otro lado, en la figura 5.4, se muestran los recuentos microbianos en función de la concentración de sales biliares en el medio de cultivo.

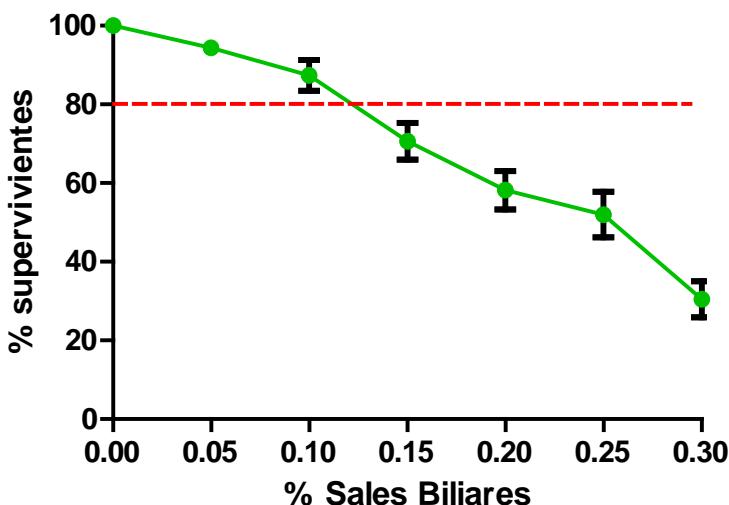


Figura 5.4. Recuento de células en medio selectivo, TSA-EL con distintas concentraciones de sales biliares, expresado en porcentaje respecto al recuento en medio no selectivo (TSA-EL). La línea roja discontinua indica el límite de recuento mínimo para la determinación de la CMNI. Se muestra la media y la desviación estándar de tres réplicas.

Los resultados reflejaron una disminución del recuento microbiano conforme se aumentó la concentración de sales biliares en el medio de cultivo. A partir de concentraciones de 0,15% p/v de sales biliares, inclusive, supuso un recuento inferior al 80% respecto al medio no selectivo. Por ello, se estableció el **0,10% p/v como CMNI de sales biliares** para la cepa *E. coli* MC4100 y fue la empleada para la evaluación del daño subletal provocado en la membrana externa por el carvacrol.

Tras determinar las CMNI necesarias para la determinación del daño subletal, se realizaron los tratamientos a distintas concentraciones de carvacrol para evaluar la inactivación y los daños subletales sobre las envolturas celulares.

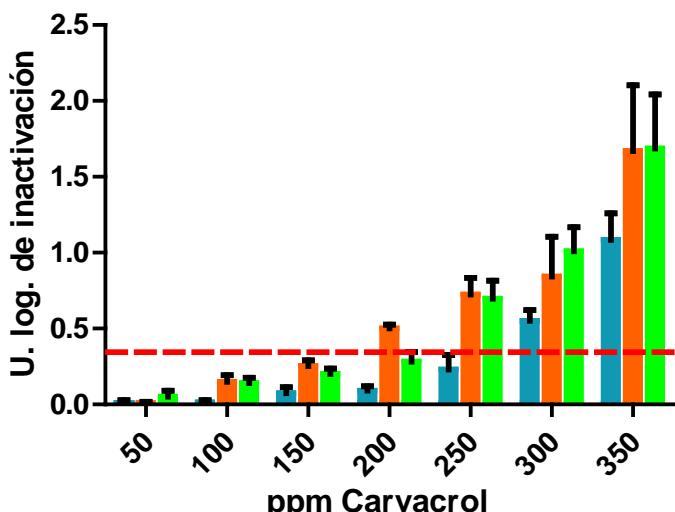


Figura 5.5. Inactivación de las células sometidas a diferentes concentraciones de carvacrol durante 10 minutos. Los recuentos se realizaron en medio no selectivo, TSA-EL (■), y en medios selectivos, con 5% de cloruro sódico (■) y con 0,1% de sales biliares (■). La línea roja discontinua indica el límite máximo de inactivación establecida para la evaluación de la expresión génica.

En la figura 5.5 se observa que tratamientos con concentraciones de 300 y 350 ppm de carvacrol fueron demasiado intensos, ya que provocaron inactivaciones superiores al 50%. Con estos datos se seleccionó la **concentración de 250 ppm de carvacrol**, ya que mostró una escasa inactivación (40%) pero con importantes daños subletales en ambas membranas celulares en los microorganismos supervivientes: membrana citoplasmática (67% de las células supervivientes) y membrana externa (65% de las células supervivientes). De esta manera, se establecieron unas condiciones de tratamiento en las que la mayoría de la población microbiana resultaba afectada por el tratamiento y probablemente era capaz de elaborar una respuesta transcripcional frente al tratamiento.

Una vez fijado el tratamiento de carvacrol, se aplicó el protocolo del ensayo de la actividad β -galactosidasa sobre las células tratadas bajo estas condiciones. Se observó que **los genes no se encontraban de igual forma expresados frente a tratamientos sub-inhibitorios con carvacrol que frente a un tratamiento letal con el mismo antimicrobiano** (Figura 5.6). En este caso, la mayoría de genes no mostraron activación frente al carvacrol. Únicamente se detectó una **activación del gen *rpoH*** similar a la detectada en condiciones sub-inhibitorias, lo que **implicaría directamente a este gen**

en la resistencia frente a tratamientos de inactivación microbiana mediante carvacrol, y reforzaría la importancia de este gen en la resistencia microbiana frente a este compuesto. Sin embargo, otros genes como *lon*, no presentaron activación pero mantuvieron los valores de represión obtenidos frente a tratamientos sub-inhibitorios, o *cpxR*, que pese a sufrir una represión lo hizo en menor medida frente a tratamientos de inactivación.

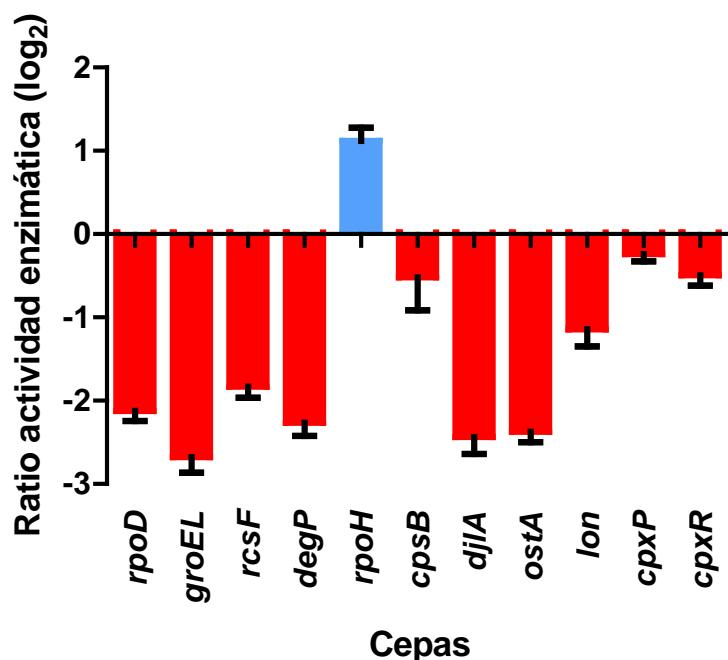


Figura 5.6. Evaluación de la expresión génica mediante el ratio de la actividad enzimática de la β -galactosidasa entre las células crecidas en presencia de carvacrol (50ppm) y las crecidas en su ausencia, expresado en \log_2 . Se muestra la media y la desviación estándar de tres réplicas de las diferentes cepas de estudio, que reflejan sobreexpresión (■) o represión (■).

La **sobreexpresión del gen *rpoH*** frente a tratamientos letales de carvacrol, podría deberse a que el factor σ^{32} responde **frente a estreses celulares externos**. Por otro lado, se ha demostrado que σ^{32} posee una estabilidad muy baja, menos de 1 minuto a 37°C (Tilly *et al.*, 1989), lo que indicaría que la bacteria precise de una **gran expresión de este gen para desarrollar y mantener su mecanismo de resistencia**. Por tal razón, la activación de gen *rpoH* se considera **muy importante en el mecanismo de resistencia frente al carvacrol**.

Los valores de expresión génica obtenidos probablemente están íntimamente relacionados con la intensidad de tratamiento ensayada. Se entiende que estos valores se verían modificados por la concentración del antimicrobiano y la duración de los tratamientos, e incluso podría influir el medio de tratamiento. Así, un menor tiempo de tratamiento, podría permitir únicamente la expresión de los genes más importantes de la célula en su resistencia. El aumento de intensidad provocaría que la bacteria destine todos sus recursos metabólicos a la respuesta frente al compuesto antimicrobiano.

Por todos estos motivos, estos primeros resultados se consideran una primera aproximación al posible uso de esta técnica de evaluación de la expresión génica en experimentos de inactivación microbiana. No obstante, se precisan más estudios e investigaciones de transcriptómica en un rango de condiciones experimentales más amplio, para poder llegar a conocer en profundidad los genes implicados en resistencia microbiana y sus mecanismos de actuación. Estos resultados permitirán el desarrollo y optimización de métodos de conservación de alimentos más efectivos, que contribuirán a ampliar la vida útil de los productos y ofrecer mayores garantías sanitarias.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas con la realización de este Trabajo Fin de Grado son las siguientes:

1. Los mutantes obtenidos a partir de diferentes construcciones transcripcionales del mismo gen empleados en el estudio no mostraron diferencias en su expresión.
2. Los genes *rpoH*, *cpsB* y *cpxP* reflejaron una elevada sobreexpresión frente a los tratamientos sub-inhibitorios con 50 ppm de carvacrol en LB durante 3-4 horas. Esta respuesta podría indicar que los genes en cuestión estarían implicados en la resistencia bacteriana frente al carvacrol durante la fase de crecimiento exponencial, principalmente por su actuación en las envolturas celulares de la bacteria. Aunque otros genes como *rpoD*, *groEL* y *ostA* mostraron una menor sobreexpresión, no se podría concluir que su implicación en la resistencia fuera menor. Por otro lado, no se detectó sobreexpresión de genes habitualmente implicados en la respuesta bacteriana al estrés, como *rcsF*, *djlA*, *lon*, *cpxR* y *degP*, por lo que se descartaría su implicación en la respuesta bacteriana frente al carvacrol.
3. Frente a los tratamientos letales la mayoría de los genes estudiados no mostraron sobreexpresión. Sin embargo, se detectó una importante activación de la expresión de *rpoH* lo que indicaría que esta RNA polimerasa relacionada con la respuesta a estreses en las envolturas celulares, es clave en la respuesta de la bacteria frente al carvacrol.

Conclusions

The main conclusions obtained from this Final Project are:

1. The mutant strains used in this study, derived from different transcriptional constructions with the same gene, showed no significant difference in expression.
2. *rpoH*, *cpsB* and *cpxP* genes showed a high overexpression due to a sub-inhibitory treatment with 50 ppm of carvacrol in LB for 3-4 hours. This response may indicate that these genes are involved in bacterial resistance to carvacrol during the exponential growth phase, due to its activity in the bacterial cell envelopes. Although other genes, as *rpoD*, *groEL* and *ostA*, showed less overexpression, it cannot be concluded that their involvement in the resistance is less important than other genes with a higher expression. Overexpression of other genes involved in bacterial stress responses, such as *rcsF*, *djlA*, *lon*, *cpxR* and *degP* was not detected, discarding their involvement in *E. coli* response to carvacrol.
3. Most of the studied genes were not overexpressed during a lethal treatment with carvacrol. However, an important activation of *rpoH* expression was detected, indicating the importance in the mechanisms of bacterial resistance of this RNA polymerase related to stresses in cell envelopes.

7. Aportaciones en materia de aprendizaje

La realización del Trabajo Fin de Grado permite desarrollar capacidades de planificación y organización del estudio de forma autónoma, exige la toma de decisiones relevantes en el estudio, con la responsabilidad que conlleva, y precisa de una autoevaluación y crítica del propio trabajo realizado. En mi opinión, una de las competencias más importante, y, a la vez, más costosa de adquirir.

La temática de la genética microbiana, siempre me ha parecido una rama de estudio interesante, sin embargo, en la titulación los conocimientos aportados en este ámbito son escasos. La puesta a punto de una técnica de este campo me ha exigido, y a la vez permitido, documentarme de forma exhaustiva para la utilización de compuestos antimicrobianos naturales como métodos de conservación, el empleo de forma correcta de las herramientas moleculares necesarias, hasta entonces desconocidas para mí, y el desarrollo de las técnicas precisas para llevar a cabo la evaluación génica microbiana.

Por otra parte, también he conseguido desarrollar otras competencias, englobadas en la titulación, con la consecución de este Trabajo Fin de Grado:

- Buscar, analizar y sintetizar información en torno a temas de genética, microbiología y tecnología, entre otras.
- Conocer, comprender e interpretar los fundamentos de las técnicas empleadas.
- Planificar y optimizar el trabajo de laboratorio, adquiriendo una mayor experiencia y destreza en el manejo instrumental.
- Obtener, analizar y representar resultados de forma correcta para extraer conclusiones veraces y fiables.
- Elaborar y emitir informes técnicos, en español e inglés, de forma concisa y clara.

8. Bibliografía

- ✓ Ait-Ouazzou, A., 2012. Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas de origen mediterráneo y evaluación de su actividad antimicrobiana en combinación con otros métodos de conservación de alimentos (tesis doctoral). Zaragoza (España): 27-56.
- ✓ Aono, R., Negishi, T., Aibe, K., Inoue, A., Horikoshi, K., 1994. Mapping of organic solvent tolerance gene *ostA* in *Escherichia coli* K-12. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 58 (7): 1231-1235.
- ✓ Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.
- ✓ Batchelor, E., Walthers, D., Kenney, L.J., Goulian, M., 2005. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins *ompF* and *ompC*. Journal of Bacteriology, 187 (16): 5723-5731.
- ✓ Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Gardini, F., 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(23): 6932-6938.
- ✓ Bianchi, A.A., Banexy, F., 1999. Hyperosmotic shock induces the sigma 32 and sigma E stress regulons of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 34 (5): 1029-1038.
- ✓ Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
- ✓ Burt, S., Vlielander, R., Haagsman, H.P., Veldhuizenl, E. J. A., 2005. Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157:H7 by addition of food stabilizers. Journal of Food Protection, 68: 919–926.
- ✓ Burt, S., van der Zee, R., Koets, A.P., de Graaff, A.M., van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E.J.A, 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 73: 4484-4490.

- ✓ Castanié-Cornet, M.P., Cam, K., Jacq, A., 2006. RcsF is an outer membrane lipoprotein involved in the RcsCDB phosphorelay signaling pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188 (12): 4264-4270.
- ✓ Cebrián, G., 2009. Mecanismo de inactivación y resistencia de *Staphylococcus aureus* a diferentes procesos de conservación de los alimentos (tesis doctoral). Universidad de Zaragoza, España.
- ✓ Centro Nacional de Epidemiología (CNE), Área de Vigilancia de Salud Pública, 2011. Brote de *Escherichia coli* O104:H4 productor de toxina shiga en Alemania. mayo-julio de 2011. *Boletín epidemiológico semanal*, 19 (7).
- ✓ Chueca, B., Pagán, R., García-Gonzalo, D., 2015. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* MG1655 cells exposed to pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27: 78-86.
- ✓ Conner, D.E., 1993. Naturally occurring compounds, antimicrobial in foods. Marcel Dekker, Inc. New York (U.S.A): 441-468.
- ✓ Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L., 2005. Antimicrobials in food, third edition. Taylor and Francis Groups. Florida (U.S.A.): 429-452.
- ✓ DiGiuseppe, P.A., Silhavy, T.J., 2003. Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *Journal of Bacteriology*, 185 (8): 2432-2440.
- ✓ Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- ✓ Dozal, M., Cruz, C.F., Díaz, J.A., Miranda, M.G., 2010. Técnicas de análisis de aceite esencial de orégano por cromatografía de gases. Instituto Tecnológico de Durango.
- ✓ Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or combined processes. *Food Control*, 22: 896-902.
- ✓ European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12 (2): 3547.

- ✓ Food and Agriculture Organization (FAO), 2011. Ahorrar para crecer, guía para los responsables de las políticas de intensificación sostenible de la producción agrícola en pequeña escala.
- ✓ Foresight, 2011. El futuro de los alimentos y la agricultura: retos y opciones para la sostenibilidad a nivel mundial. Oficina del Gobierno para la Ciencia, Londres.
- ✓ Fried, L., Lassak, J., Jung, K., 2012. A comprehensive toolbox for the rapid construction of *lacZ* fusion reporters. Journal of Microbiological Methods, 91 (3): 537-43.
- ✓ Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 6042-6048.
- ✓ Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65: 1545-1560.
- ✓ Griffith, K.L., Wolf, R.E.Jr., 2002. Measuring b-galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. Biochemical and Biophysical Research Communications, 290: 397–402.
- ✓ Gutiérrez, A., Lauretil, L., Crussard, S., Abidal, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., Matic, I., 2013. β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. Nature communications, 4: 1610.
- ✓ Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essentials oils and their plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86: 985-990.
- ✓ Held, P., 2007. Kinetic analysis of β -galactosidase activity using the power waveTM HT and Gen5TM data analysis software. BioTek Instruments, Vermont (U.S.A.).
- ✓ Horwich, A.L., Low, K.B., Fenton, W.A., Hirshfield, I.N., Furtak, K., 1993. Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. Cell, 74 (5): 909-917.
- ✓ Jones, F.A., 1996. Herbs-useful plants. Their role in history and today. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 8: 1227-1231.

- ✓ Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626-631.
- ✓ Kelley, W.L., Georgopoulos, C., 1997. Positive control of the two component RcsC/Bsignal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 25 (5): 913-931.
- ✓ Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 174: 233-238.
- ✓ Laskowska, E., Kuczyńska-Wiśnik, D., Skórko-Głonek, J., Taylor, A., 1996. Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Molecular Microbiology*, 22 (3): 555-571.
- ✓ Lis-Balchin, M., Deans, S.G., 1997. Bioactivity of selected plant essentials oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 82: 759-762.
- ✓ Lucini, E.I., Zunino, M.P., López, M. L., Zygodlo, J.A., 2006. Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154: 441-446.
- ✓ Maciag, A., Peano, C., Pietrelli, A., Egli, T., De Bellis, G., Landini, P., 2011. In vitro transcription profiling of the σS subunit of bacterial RNA polymerase: redefinition of the σS regulon and identification of σS-specific promoter sequence elements. *Nucleic Acids Research*, 39 (13): 5338-5355.
- ✓ Mackey, B.M., 2000. Injured bacteria, in the microbiological safety and quality of food. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., Editors. Aspen Publisher, Inc: Gaithersburg, Maryland: 315-341.
- ✓ Mañas, P., R. Pagán, 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6): 1387-1399.
- ✓ Miller, J. H., 1972. Experiments in molecular genetics. ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York (U.S.A.).
- ✓ Nellemann, C., MacDevette, M., Manders, T., Eickhout, B., Svhuis, B., Prins, A. G., Kaltenborn, B. P., 2009. The environmental food crisis - The environment's role in averting future food crises. A UNEP rapid response assessment.

- ✓ Phillips, G.J., Silhavy, T.J., 1990. Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of *LacZ* hybrid proteins in *E. coli*. *Nature*, 344 (6269): 882-884.
- ✓ Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholera* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110: 614-619.
- ✓ Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Dellmare, A.P.L., Echeverrigaray, S., 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Braz, species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 823-828.
- ✓ Serebriiskii, I.G., Golemis, E.A., 2000. Uses of *lacZ* to study gene function: evaluation of b-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system-Review. *Analytical Biochemistry*, 285: 1-15.
- ✓ Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.J.E., 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 13: 65–75.
- ✓ Skocibusic, M., Bezic, N., 2004. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research*, 18 (1): 967-970.
- ✓ Sledjeski, D.D., Gottesman, S., 1996. Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 178 (4): 1204-1206.
- ✓ Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R., 2012. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108 (6): 1928-1939.
- ✓ Southward, C., Surette, M.G., 2002. The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Molecular Microbiology*, 45: 1191-1196.
- ✓ Strauch, K.L., Johnson, K., Beckwith, J., 1989. Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *Journal of Bacteriology*, 171 (5): 2689-2696.
- ✓ Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A.B., Schuldiner, S., 1987. An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169 (2): 885-887.

- ✓ Tilly, K., Spence, J., Georgopoulos, C., 1989. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor sigma. *Journal of Bacteriology*, 171 (3): 1585-1589.
- ✓ Trisler, P., Gottesman, S., 1984. *lon* transcriptional regulation of genes necessary for capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 160 (1): 184-191.
- ✓ Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M., 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20: 1073-1079.
- ✓ Van Bogelen, R.A., Kelley, P.M., Neidhardt, F.C., 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169 (1): 26-32.
- ✓ Viuda, M., Ruiz, Y., Fernández, J., Pérez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulate L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control*, 19 (12): 1130-1138.
- ✓ World Health Organization (WHO), 2008. *Foodborne Disease Outbreaks: Guidelines for Investigation and Control*.
- ✓ Wu, T., McCandlish, A.C., Gronenberg, L.S., Chng, S.S., Silhavy, T.J., Kahne, D., 2006. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (31): 11754-11759.
- ✓ Yano, R., Imai, M., Yura, T., 1987. The use of operon fusions in studies of the heat-shock response: effects of altered sigma 32 on heat-shock promoter function in *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, 207 (1): 24-28.