



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Control de biofilms de Pseudomonas mediante la utilización de aceites esenciales

Control of Pseudomonas biofilms by essential oils

Autor/es

Héctor García Casanova

Director/es

Diego García Gonzalo
Natalia Merino Almalé

Facultad de Veterinaria

2020/21

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. <i>Pseudomonas</i> spp. y su importancia en la industria alimentaria	4
2.2. <i>Biofilms</i>: características y formación	5
2.3. Aceites esenciales y su potencial para eliminar <i>biofilms</i>	8
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	11
4.2. Formación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1	11
4.3. Cuantificación de la formación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1.....	12
4.3.1. Disgregación del biofilm de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1 con ultrasonidos	12
4.3.2. Cuantificación del biofilm por densidad óptica a 595 nm (DO_{595})	12
4.3.3. Cuantificación del biofilm mediante la técnica de recuento en placa.	13
4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de carvacrol frente a las células planctónicas de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1	13
4.5. Eliminación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1 mediante el uso de carvacrol	14
4.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1. Formación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1	15
5.1.1. Cuantificación de la formación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1	16
5.2. Eliminación de <i>biofilms</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1 mediante el uso de carvacrol	17
5.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)	17
5.2.2. Eliminación del biofilm de <i>Pseudomonas</i> sp. SP1.....	20
6. CONCLUSIONES.....	24
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

El crecimiento microbiano es la causa más común de alteración de los alimentos. La carne es muy susceptible a alterarse dadas las características favorables que presenta para la multiplicación bacteriana. El principal agente alterante de la carne es *Pseudomonas* spp., una bacteria que puede nutrirse de una gran variedad de compuestos además de los hidratos de carbono y que es psicrótrofa, es decir, que puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Estas cualidades sumadas a su capacidad de formar *biofilms* la convierten en un problema persistente de contaminación y posterior alteración de la carne. Los *biofilms* confieren mayor resistencia a los desinfectantes a los microorganismos que contienen, por eso se están investigando nuevas maneras de erradicarlos, como los aceites esenciales o sus componentes individuales, como el carvacrol. Por esta razón, este Trabajo de Fin de Grado pretende estudiar la formación de *biofilms* de *Pseudomonas* spp. y su eliminación con carvacrol.

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizó la cepa de *Pseudomonas* sp. SP1 aislada de carne de pollo. Primero se caracterizó la formación de *biofilms* de la cepa a lo largo de 24, 48, 72 y 96 h, tanto de su biomasa mediante la medición de la densidad óptica a 595 nm (DO_{595}), como del número de células sésiles mediante la técnica de recuento en placa. De este modo, se determinó el punto máximo de maduración del *biofilm* a las 72 h. Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de las células planctónicas de la cepa frente a carvacrol, obteniéndose los valores de 400 y 800 μ L/L, respectivamente. Los ensayos de eliminación del *biofilm* con carvacrol revelaron que el tratamiento a 25 °C durante 1 h en medio de pH 4,0 con 2.000 μ L/L de carvacrol (2,5x CMB) resultó ser el más eficaz, inactivando más de 5 ciclos logarítmicos de células sésiles del *biofilm* de 72 h de *Pseudomonas* sp SP1.

ABSTRACT

Microbial growth is the most common cause of food spoilage. Meat is very susceptible to spoilage due to its favourable characteristics for bacteria proliferation. The main spoilage agent of meat is *Pseudomonas* spp., a bacterium that can feed on a wide variety of compounds in addition to carbohydrates and is psychrotrophic, i.e., it can proliferate under refrigeration conditions. These characteristics together with its ability to produce biofilms make it a persistent problem of contamination and subsequent spoilage of meat. Biofilms confer greater resistance to disinfectants to those microorganisms they contain, therefore new ways of eradication are being investigated, such as essential oils or their individual constituents, as carvacrol. Because of that, this Final Project intends to study biofilm formation of *Pseudomonas* spp. and its elimination with carvacrol.

To carry out this project, a strain of *Pseudomonas* sp. SP1 isolated from poultry meat was used. Firstly, the biofilm formation of the strain was assessed over 24, 48, 72 and 96 h, measuring biomass by optical density at 595 nm (OD_{595}) and total plate count of sessile cells. In this way, the maturation maximum at 72 h was determined. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of carvacrol for planktonic cells of the strain were determined, obtaining values of 400 and 800 $\mu L/L$, respectively. The biofilm elimination experiments with carvacrol showed that the treatment at 25 °C for 1 h in pH 4.0 medium with 2,000 $\mu L/L$ of carvacrol (2.5x MBC) was the most effective, inactivating more than 5 logarithmic cycles of sessile cells of the 72 h biofilm of *Pseudomonas* sp. SP1.

2. INTRODUCCIÓN

En 2019 el 17 % de la comida que se produjo en el mundo se desperdió según estimaciones del United Nations Environment Programme (2021). El desperdicio o desecho de alimentos ocasiona enormes pérdidas económicas para todas las partes de la cadena alimentaria, tanto para productores, como para vendedores y consumidores. Además, el desperdicio de alimentos contribuye de manera importante a los problemas medioambientales del planeta (Odeyemi *et al.*, 2020), al desaprovechar a su vez los recursos con los que se han producido esos alimentos.

Una de las razones por la que se desechan los alimentos es su alteración en distintas etapas de la cadena alimentaria (Morales *et al.*, 2016; Wang, Yuan and Tang, 2021). Un alimento se considera alterado cuando sus características sensoriales, físicas, químicas o microbiológicas se han visto modificadas negativamente y hacen que el alimento deje de ser apetecible o apto para el consumo humano (Blackburn, 2006; Petruzzi *et al.*, 2017; Odeyemi *et al.*, 2020).

El crecimiento microbiano es la causa más común de alteración de los alimentos (Odeyemi *et al.*, 2020). Los microorganismos alterantes (bacterias, mohos y levaduras) transforman los compuestos de los alimentos (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) para obtener energía y poder multiplicarse produciendo como consecuencia una gran variedad de metabolitos responsables de los cambios negativos en las propiedades de los alimentos (Petruzzi *et al.*, 2017). Por lo general, las bacterias son las responsables de los deterioros más rápidos y notables en los alimentos proteicos; sin embargo, los mohos y levaduras, aun presentando un crecimiento más lento, también son agentes de deterioro muy importantes, pues son capaces de soportar condiciones más extremas y nutrirse de una gran variedad de sustratos (Blackburn, 2006).

La microbiota alterante de un alimento se compone de dos grupos: a) la microbiota natural o salvaje que se encuentra en el alimento, la cual depende de las condiciones ambientales en las que se ha producido, y b) la que adquiere por contaminación cruzada durante o tras su procesado. Esta última puede proceder de varias vías, principalmente por contacto con superficies, equipos y utensilios contaminados, y por manipulación poco higiénica de los operarios (Kreyenschmidt and Ibal, 2012).

Aunque la gran mayoría de los alimentos es susceptible de alteración microbiológica, la carne resulta especialmente sensible, siendo uno de los alimentos más perecederos dado el excelente entorno que ofrece para la multiplicación microbiana: alta concentración de nutrientes y elevada actividad de agua (Húngaro *et al.*, 2016). Los grupos principales de

microorganismos alterantes que se han descrito en carne bajo diferentes condiciones de almacenamiento incluyen miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido-lácticas (géneros *Carnobacterium*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*), *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., *Brochothrix thermosphacta* y *Shewanella putrefaciens* (Odeyemi et al., 2020), siendo *Pseudomonas* spp. su principal agente de alteración (G. Wang et al., 2021).

2.1. *Pseudomonas* spp. y su importancia en la industria alimentaria

Pseudomonas es un género de bacterias Gram negativas con morfología de bastón (1,5-5,0 µm de largo por 0,5-1,0 µm de diámetro), normalmente aerobias estrictas, aunque pueden crecer en anaerobiosis si disponen de una fuente de nitrato, móviles, formadoras de *biofilms* y no esporuladas (Dodd, 2014; Andreani and Fasolato, 2017; Wisplinghoff, 2017).

Pseudomonas spp. presenta una gran flexibilidad metabólica, pudiendo nutrirse de una gran variedad de compuestos además de los hidratos de carbono (ácidos, aminoácidos, lípidos, triglicéridos, pectinas, proteínas y péptidos), así mismo, no necesita factores de crecimiento para multiplicarse (Dodd, 2014). Por otro lado, *Pseudomonas* spp. es psicrótrofa, es decir, puede multiplicarse en condiciones de refrigeración (Dodd, 2014; Andreani and Fasolato, 2017). Estas características la hacen ser más competitiva que otros microorganismos y le permite adaptarse y sobrevivir en diferentes medios (Dodd, 2014). Tanto es así que es ubicuitaria (Andreani and Fasolato, 2017), encontrándose ampliamente distribuida en el agua, suelo y vegetación, lo cual implica que termina estando presente en todo tipo de alimentos frescos como huevos, leche, carne, marisco y vegetales (Dodd, 2014).

Generalmente *Pseudomonas* spp. se comporta como alterante de los alimentos (Andreani and Fasolato, 2017) y dadas sus características, en alimentos almacenados en condiciones de refrigeración y aerobiosis, como la carne, desplaza al resto de microorganismos y se convierte en la principal responsable de su alteración (Dodd, 2014). Las principales especies responsables de la alteración de la carne son, en primer lugar, *P. fragi*, seguida de *P. lundensis*, *P. fluorescens* y *P. putida* (Mohareb et al., 2015; Zagorec and Champomier-Vergès, 2017; Stanborough et al., 2018; Katiyo et al., 2020), las cuales producen proteólisis y, consecuentemente, alteraciones de aspecto (limo), color (manchas verdes/azules o decoloración), olor (desagradable) y sabor (amargo, agrio, rancio y/o ácido) (Bautista, 2014; Wang et al., 2017; Zagorec and Champomier-Vergès, 2017; Chaichi et al., 2021). Por otro lado, *Pseudomonas* spp. también tiene una especie patógena oportunista, *P. aeruginosa*, que tiene mucho protagonismo en infecciones nosocomiales (Wisplinghoff, 2017).

Pseudomonas spp. tiene la habilidad de formar *biofilms*, permitiéndole persistir en las superficies y convertirse en una fuente de contaminación o recontaminación habitual en las zonas de procesado de alimentos (Dodd, 2014). Esto resulta muy recurrente y preocupante en la industria cárnica, ya que es el principal agente de alteración de la carne y es frecuente que su vida útil se vea limitada por el crecimiento de estas bacterias, incurriendo, finalmente, en grandes pérdidas económicas (Giaouris *et al.*, 2014).

2.2. Biofilms: características y formación

Las bacterias pueden crecer, en general, de dos formas distintas: en forma planctónica, esto es, libres flotando en el medio, y en forma sésil, es decir, adheridas a una superficie formando un *biofilm* (Espina *et al.*, 2017). Los *biofilms* se definen como agregados de microorganismos en los que las células están embebidas en una matriz que está adherida a una superficie viva o inerte (González-Rivas *et al.*, 2018). Esta superficie o sustrato puede ser de cualquier naturaleza, desde sólida hasta una interfase aire-líquido, aire-sólido o sólido-líquido (Figura 1.1) (Flemming and Wuertz, 2019). La matriz en la que se encuentran los microorganismos está producida por ellos mismos y está principalmente compuesta de agua (97 %) (Flemming *et al.*, 2016). Además, contiene exopolisacáridos (EPS), proteínas y DNA extracelular (Flemming and Wuertz, 2019). Los *biofilms* pueden estar compuestos de una o múltiples especies microbianas y parece que cualquier bacteria, si se dan las condiciones ambientales adecuadas, puede formar un *biofilm* (González-Rivas *et al.*, 2018). La formación de *biofilms* está condicionada por múltiples factores: la cepa bacteriana, las características de la superficie (hidrofobicidad, mojabilidad y rugosidad), las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, pH, osmolaridad y nivel de O₂), las concentraciones de nutrientes y la presencia de otros microorganismos (Giaouris *et al.*, 2014; Fysun *et al.*, 2019).

El proceso de formación de los *biofilms* consta de varias etapas: adhesión inicial, adhesión irreversible, desarrollo temprano de la arquitectura del *biofilm*, maduración y dispersión (Srey, Jahid and Ha, 2013) (Figura 1.2). En la fase de adhesión inicial, la unión de la bacteria puede ser activa o pasiva, dependiendo de su motilidad. La adherencia de la célula depende de las propiedades físico-químicas de la membrana bacteriana (Srey, Jahid and Ha, 2013), produciéndose por fuerzas de van der Waals e interacciones estéricas, electrostáticas e hidrofílicas (Fysun *et al.*, 2019). Al principio, las células solo poseen una pequeña cantidad de EPS y la unión es, por tanto, reversible, pues las bacterias aún no han sufrido el proceso de diferenciación morfológica que les permite formar el *biofilm*, y muchas células pueden

desprenderse y volver a la forma planctónica de crecimiento (Srey, Jahid and Ha, 2013). Tras esta primera unión, las bacterias cambian su forma de interactuar con el sustrato, pasando de ser una interacción débil a una permanente, es decir, de reversible a irreversible, gracias a la presencia de EPS (Srey, Jahid and Ha, 2013). Dichas nuevas interacciones son: dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, iónicos y covalentes (Fysun *et al.*, 2019). La arquitectura del *biofilm* comienza a desarrollarse con la producción de EPS que permiten que las células se asocien entre sí al multiplicarse y se acumulen formando microcolonias. Estas microcolonias refuerzan la unión entre la superficie y las bacterias y estabilizan la colonia frente a cualquier estrés ambiental (Srey, Jahid and Ha, 2013). A continuación, se da la maduración del *biofilm* desarrollándose una estructura organizada que puede tener distintas formas. Las bacterias crecen en forma sésil formando microcolonias separadas por canales de agua (Srey, Jahid and Ha, 2013). Por último, se produce la dispersión del *biofilm*. Es la última etapa del ciclo de formación y consiste en que algunas de las células se desprenden y vuelven al estado planctónico. Con este desprendimiento se consigue colonizar nuevos nichos (Sauer *et al.*, 2002) y suele estar motivado por la escasez de nutrientes (O'Toole, Kaplan and Kolter, 2000).

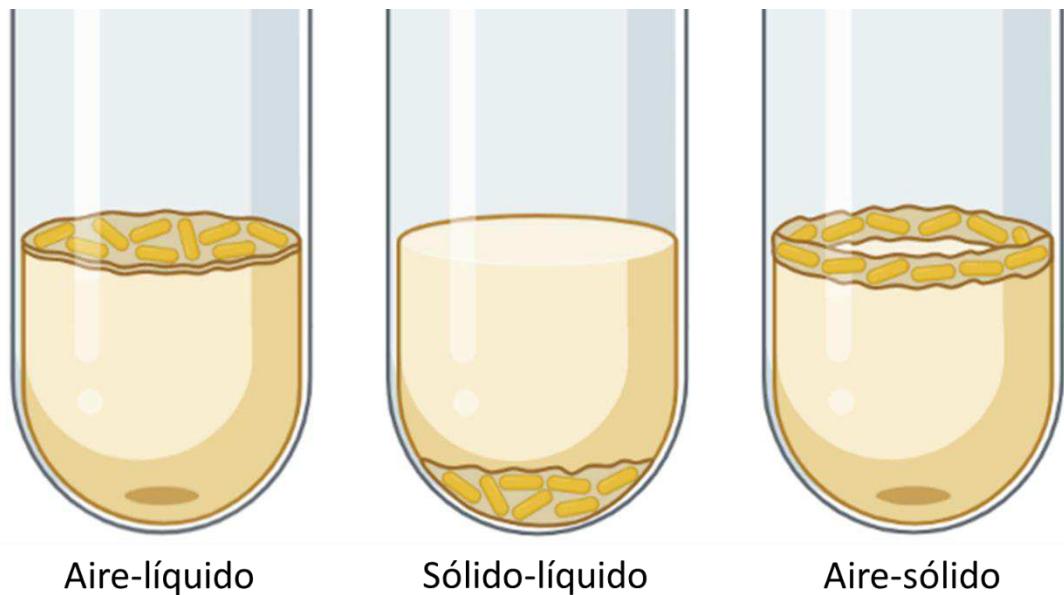


Figura 1.1. Ejemplos, representados en tubos de ensayo con caldo de cultivo, de interfases sobre las que pueden formarse *biofilms* además de las superficies sólidas. Realizado con BioRender.com.

Existen tipos de *biofilms* muy variados y no todos tienen las mismas características, pero, generalmente, los *biofilms* proporcionan a las células que contienen varias ventajas: retienen el

agua y las protegen de la deshidratación, retienen enzimas extracelulares en la matriz convirtiéndola en un sistema digestivo externo, permiten el reciclaje de nutrientes y el uso sinérgico de estos; y las protegen frente a los compuestos antimicrobianos (Flemming and Wuertz, 2019), incluyendo desinfectantes, metales pesados y antibióticos de bajo peso molecular (Flemming *et al.*, 2016). Esta protección frente a los compuestos antimicrobianos se debe a varios mecanismos que pueden combinarse. Por un lado, la matriz de EPS forma una barrera que limita la difusión de los antimicrobianos hacia el interior del *biofilm* (Giaouris *et al.*, 2014). Esta forma de inhibición engloba varias reacciones posibles. Por una parte, la matriz de EPS puede degradar enzimáticamente los compuestos antimicrobianos o quitarlos formando complejos, y, por otra parte, la matriz puede sufrir una degradación parcial por una reacción de oxidación, de manera que el antimicrobiano ataca a los EPS antes que a las células. De esta manera se evita que los compuestos antimicrobianos lleguen hasta las células a una concentración letal (Flemming *et al.*, 2016). Por otro lado, los otros mecanismos de resistencia son: la diferenciación de las bacterias en distintos estados fisiológicos (p.e. latencia); la disminución de la tasa de replicación (Flemming *et al.*, 2016); y la modificación de las condiciones del entorno interior del *biofilm*, p. e. pH, que pueden disminuir la eficacia de los compuestos antimicrobianos (Giaouris *et al.*, 2014). Estos mecanismos de resistencia redundan en que parte de las células del *biofilm* se ve expuesta a concentraciones subletales de ciertos antimicrobianos y puede desarrollar resistencia a ellos, la cual puede transmitirse al resto de bacterias del *biofilm* horizontalmente por conjugación bacteriana (Flemming *et al.*, 2016).

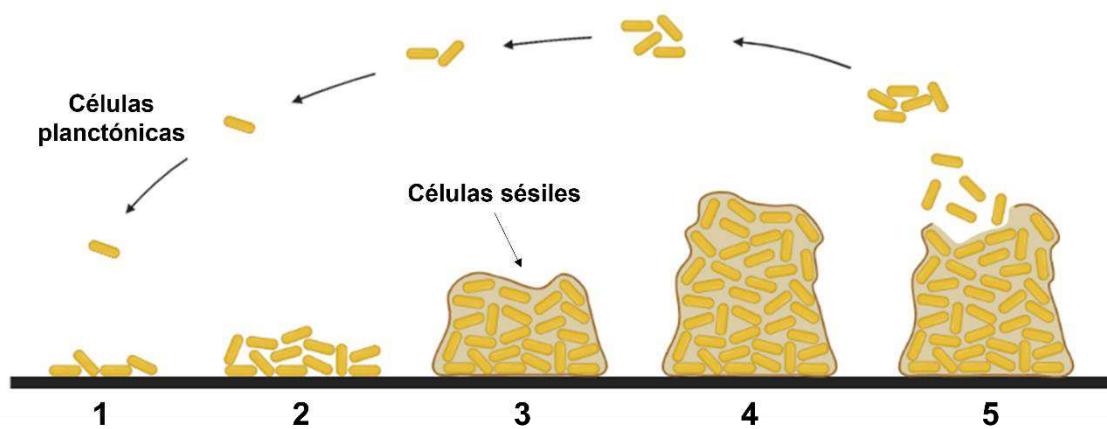


Figura 1.2. Etapas de formación de un *biofilm*: (1) adhesión inicial, (2) adhesión irreversible, (3) desarrollo temprano de la arquitectura del *biofilm*, (4) maduración y (5) dispersión. Realizado con BioRender.com.

Esta mayor resistencia de los *biofilms* frente a los compuestos antimicrobianos hace que puedan presentar una mayor resistencia frente a diferentes sistemas de limpieza y desinfección, suponiendo un problema para la industria alimentaria (Simões, Simões and Vieira, 2010). Estos sistemas habitualmente consisten en una primera etapa de retirada en seco de restos macroscópicos sobre las superficies o equipos a limpiar, seguida de una aplicación de una solución detergente para retirar los restos de comida adheridos o no tan visibles, un aclarado y finalmente la aplicación de un desinfectante para inactivar los microorganismos restantes. Los desinfectantes utilizados comúnmente son: cloro, dióxido de cloro, yodóforos, sales de amonio cuaternarias, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y ozono (Kakurinov, 2014). Dada la mayor resistencia de los *biofilms* a estos compuestos, se están buscando alternativas de desinfección, por ejemplo, utilizando ultrasonidos, detergentes enzimáticos, agua electrolizada o fagos (Simões, Simões and Vieira, 2010; Srey, Jahid and Ha, 2013; Fernández-Gómez *et al.*, 2020). Una alternativa que ha suscitado mucho interés en los últimos años es la utilización de aceites esenciales (AEs) o de algunos de sus componentes, como el carvacrol, debido a su actividad antimicrobiana (Giaouris *et al.*, 2014; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019).

2.3. Aceites esenciales y su potencial para eliminar *biofilms*

Los aceites esenciales son mezclas complejas de sustancias volátiles producidas de forma natural por las plantas que se pueden obtener de sus distintas partes (p. e. flores, hojas, semillas o frutos) normalmente por destilación a vapor. A pesar de tener una composición muy variada en cuanto a número y concentración de sustancias, los aceites esenciales suelen presentar dos o tres compuestos mayoritarios que generalmente determinan sus propiedades biológicas (Tariq *et al.*, 2019). Se ha demostrado en diversos estudios la actividad antimicrobiana de estos aceites y de sus compuestos individuales, los cuales dañan la pared y membrana celular provocando la lisis de las bacterias, el vertido del contenido celular y la inhibición de la fuerza protón motriz (Kavanaugh and Ribbeck, 2012; Chen *et al.*, 2021). Además de actuar sobre las células planctónicas, también se ha documentado su eficacia para inhibir la formación de *biofilms* o para eliminarlos (Giaouris *et al.*, 2014; Espina *et al.*, 2015; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019). En un estudio de Rossi *et al.* (2018) se utilizó AE de orégano (*Origanum vulgare*) y se consiguió inhibir el 100 % de la formación de los *biofilms* de varias cepas de *Pseudomonas fluorescens*, así como observar su capacidad para eliminarlos al favorecer su desprendimiento. Soni *et al.* (2013) estudiaron el efecto antimicrobiano del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) y el de orégano frente a *biofilms* de *Salmonella Typhimurium*, demostrando una disminución significativa de los *biofilms* formados en superficies de poliestireno y acero inoxidable. De una

manera similar, Lira *et al.* (2020) observaron que los AEs de orégano y de romero (*Salvia rosmarinus*) disminuían los recuentos de *biofilms* de *Salmonella Enteritidis* formados en acero inoxidable hasta estar por debajo del límite de detección. Por último, Sadekuzzaman *et al.* (2018) analizaron la actividad antimicrobiana de los AEs de tomillo y de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) frente a *biofilms* de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., observando una reducción de hasta $2,0 \times 10^3$ UFC/cm² y $1,3 \times 10^2$ UFC/cm² en superficies de acero inoxidable y caucho, respectivamente.

De los aceites esenciales procedentes de los géneros *Thymus* L. y *Origanum* L. destaca un compuesto, el carvacrol (Wijesundara *et al.*, 2021), un fenol monoterpenoide (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) e isómero del timol (Marinelli, di Stefano and Caciatore, 2018). El carvacrol actúa contra las bacterias Gram negativas de distintas formas: desintegra la membrana externa, induce modificaciones morfológicas y aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática conduciendo a la pérdida del potencial de membrana, la disipación de los gradientes de pH, el vertido de iones y otros elementos al medio y el agotamiento del ATP (Ait-Ouazzou *et al.*, 2013; Marinelli, di Stefano and Caciatore, 2018). Se ha sugerido que las claves del mecanismo de inactivación bacteriana que posee el carvacrol y, en general, los fenoles, son su hidrofobicidad junto a la presencia de un grupo hidroxilo libre y electrones deslocalizados (Ait-Ouazzou *et al.*, 2013).

La capacidad del carvacrol para eliminar *biofilms* se ha demostrado en diversos estudios. Čabarkapa *et al.* (2019) observaron una reducción de un 50 y 80 % en la biomasa de los *biofilms* de 48 h de dos cepas de *Salmonella Enteritidis* tras exponerlos a una concentración de 2x su concentración mínima bactericida (CMB) de carvacrol (313 µL/L) durante 1 h. En otro estudio de Espina *et al.* (2017) se consiguió reducir en más de 5 ciclos logarítmicos los recuentos de *biofilms* de 72 h de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes* tras exponerlos a 1.000, 1.000 y 2.000 µL/L de carvacrol, respectivamente, a 37 °C/1 h/pH 4,0 y 7,0. Por último, otros autores (Campana and Baffone, 2018) consiguieron reducir el recuento de un *biofilm* de *P. aeruginosa* por debajo del límite de detección (10^1 UFC/cm²) al incubarlo a temperatura ambiente durante 5 min con 10.000 µL/L de carvacrol.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En general, existe un gran número de estudios que analizan el efecto de los AEs sobre los *biofilms* de las bacterias patógenas más frecuentes en la industria cárnica, como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7. Sin embargo, la información es escasa acerca de tratamientos con AEs para eliminar *biofilms* de microorganismos alterantes como *Pseudomonas* spp., a pesar de ser el principal responsable de alteración de la carne.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado se centra en el estudio de la formación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1, cepa aislada de una industria cárnica, y evaluar nuevos sistemas de limpieza y desinfección que faciliten su eliminación mediante el uso de carvacrol. Para la consecución de este objetivo, se proponen los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluar la formación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1 en superficie de poliestireno.
2. Determinar la resistencia de *Pseudomonas* sp. SP1 frente a carvacrol.
3. Estudiar la eliminación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1 mediante el uso de carvacrol.

4. METODOLOGÍA

4.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

Para la realización de este trabajo se utilizó una cepa de *Pseudomonas* sp. SP1, aislada de la materia prima cárnica (contramuslos de pollo deshuesados sin piel) de la línea de elaboración de burger meats y hamburguesas de una industria cárnica. La cepa se identificó por secuenciación del gen 16S, pudiendo confirmar que pertenece al género *Pseudomonas* spp.

A lo largo del trabajo, la cepa se mantuvo en crioviales a -80 °C en un medio con glicerol (20 %). A partir de estos crioviales, se fueron realizando siembras por agotamiento en placas de Petri (90 x 14,2 mm, VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francia) estériles con agar tripticasa de soja al 4 % p/v (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementado con extracto de levadura al 0,6 % p/v (Oxoid) (TSAEL). Una vez realizada la siembra, estas placas se incubaron a 25 °C/48 h en estufa (Trade Raypa, Terrassa, España) y se almacenaron a 4 °C durante 14 días como máximo. A partir de estas placas, se procedió a realizar los precultivos, inoculando una colonia aislada en tubos de ensayo con 5 mL de caldo tripticasa de soja al 3 % p/v (Oxoid) suplementado con extracto de levadura al 0,6 % p/v (TSBEL) para posteriormente, incubar en agitación continua a 25 °C/12 h/130 revoluciones por minuto (rpm). Una vez finalizado el periodo de incubación, se procedió a realizar los cultivos en frascos de 60 mL de capacidad con 10 mL de TSBEL, en los que se inocularon los precultivos en una proporción 1:1.000 y se incubaron a 25 °C/24 h/130 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria a una concentración final de 10⁹ Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL). A partir de estos cultivos se realizaron los diferentes ensayos de este trabajo.

4.2. Formación de biofilms de *Pseudomonas* sp. SP1

Para la formación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1, se preparó el cultivo de la cepa (ver punto 4.1) y posteriormente se diluyó en TSBEL a una concentración inicial de 10⁵ UFC/mL. Una vez homogeneizado el cultivo, se añadieron 7 mL en cada pocillo de las placas de 6 pocillos de poliestireno (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza) (Figura 4.1). Estas placas se incubaron en condiciones estáticas a 25 °C durante 24, 48, 72 y 96 h.



Figura 4.1. Placa de poliestireno de 6 pocillos.

4.3. Cuantificación de la formación de *biofilms* de *Pseudomonas sp. SP1*

4.3.1. Disgregación del biofilm de *Pseudomonas sp. SP1* con ultrasonidos

Para poder cuantificar los *biofilms* formados, es necesario realizar su disgregación previamente. Tras la incubación durante los tiempos correspondientes (24, 48, 72 y 96 h), se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se procedió a lavar cada pocillo dos veces con agua destilada estéril, con el fin de eliminar los restos del medio de cultivo y aquellas células que no estaban adheridas firmemente al *biofilm*. Una vez finalizado el lavado, se añadieron 7 mL de tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich, San Luis, Estados Unidos) con Tween 20 al 1 % (Biolife, Milano, Italia) y se desprendió el *biofilm* de las paredes del pocillo con ayuda de un asa de siembra para resuspenderlo en el líquido. Posteriormente, se aplicaron 2 ciclos de sonicación de 5 s al 30 % de amplitud con un cuerno sonicador (Digital Sonifier 450, Branson Ultrasonics, Brookfield, Estados Unidos). Estas condiciones se establecieron en base a estudios previos del grupo de investigación. El cuerno sonicador se introdujo en el interior de los pocillos individualmente, de manera que se aplicaron los ultrasonidos directamente en el medio. Cada vez que se aplicó un ciclo de sonicación en un pocillo, se retiró la placa y se dejó enfriar sobre hielo durante 1,5 min para amortiguar el posible aumento de temperatura del medio.

4.3.2. Cuantificación del biofilm por densidad óptica a 595 nm (DO₅₉₅)

Tras aplicar los dos ciclos de ultrasonidos sobre la muestra, se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm mediante un espectrofotómetro (Libra S12, Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Previamente se realizó una recta de calibrado, la cual

mostró que el rango lineal se encontraba entre los valores 0 y 1 (datos no mostrados). Por esa razón, las muestras se diluyeron en la proporción correspondiente, para obtener una medida de absorbancia dentro del rango lineal.

4.3.3. Cuantificación del biofilm mediante la técnica de recuento en placa.

Paralelamente a la determinación de la DO₅₉₅, se llevó a cabo la técnica de recuento en placa. Tras la aplicación del segundo ciclo de sonicación, se tomó una alícuota de 100 µL de cada pocillo para realizar diluciones seriadas en PBS y sembrar 100 µL por extensión en superficie en placas de TSAEL. Estas placas se incubaron a 25 °C/48 h, tras lo cual se realizó el recuento de colonias manualmente.

4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de carvacrol frente a las células planctónicas de *Pseudomonas sp. SP1*

La CMI es la concentración más baja de un compuesto antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo en determinadas condiciones. Mientras que la CMB es la concentración más baja de un compuesto antimicrobiano que es capaz de inactivar 3 ciclos logarítmicos de un cultivo microbiano en determinadas condiciones.

Para ello, el procedimiento que se siguió fue el siguiente: se prepararon varios tubos de ensayo con 5 mL de TSBEL estériles a los que se adicionaron distintas concentraciones de carvacrol ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El gradiente de concentraciones utilizado fue de 50 a 900 µL/L con un intervalo de 50 µL/L. Una vez añadido el volumen necesario de carvacrol, se agitó vigorosamente en un vórtex (VORTEX Genius 3, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) para asegurar la obtención de una suspensión homogénea en el medio de cultivo. Este paso es necesario dado que los aceites esenciales presentan una baja solubilidad en medios acuosos. Posteriormente, se inocularon los tubos con los cultivos microbianos (ver punto 4.1.) a una concentración inicial de 10^5 UFC/mL y se incubaron a 25 °C/24 h/130 rpm. En todos los ensayos se incorporó un control positivo (sin antimicrobiano añadido) y un control negativo (sin cultivo microbiano añadido). Una vez transcurrido el periodo de incubación, se observaron visualmente los tubos. Aquel tubo de ensayo de menor concentración que no mostró turbidez es el que se estableció como la CMI.

Con el fin de tener una lectura objetiva de los resultados, adicionalmente, se realizó la medida de absorbancia de cada uno de los tubos por triplicado a 595 nm con un

espectrofotómetro (CLARIOstar Plus, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Se estableció que se había producido crecimiento microbiano cuando el valor de absorbancia era superior al 10 % del valor de absorbancia del control positivo.

Por otro lado, para determinar la CMB, se realizó una siembra en superficie en placas estériles de TSAEL. Se añadieron 100 µL de cada uno de los tubos que no mostraron turbidez en la CMI y posteriormente, se incubó a 25 °C/48 h en una estufa. Una vez finalizado el periodo de incubación, la menor concentración de carvacrol en la que se inactivaron al menos 3 ciclos logarítmicos de la población inicial, se estableció como la CMB (Lallemand *et al.*, 2016)

4.5. Eliminación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1 mediante el uso de carvacrol

Tras lavar los pocillos con *biofilm* dos veces con agua destilada estéril, se añadió a cada pocillo 9 mL de tampón McIlvaine a pH 4,0 y pH 7,0 (PanReac AppliChem) con carvacrol a una concentración de 2,5x CMB (2.000 µL/L), y se dejó actuar a 25 °C/1 h. La concentración de 2,5x CMB se estableció en base a estudios previos del grupo de investigación. Seguidamente, se retiró el sobrenadante con pipeta, se realizó un lavado con agua destilada estéril y se añadieron 7 mL de PBS con Tween 20 al 1 %. A continuación, se siguió el proceso de sonicación descrito en el apartado 4.3.1., para realizar el recuento de microorganismos en placa y la medida de densidad óptica a 595 nm y así determinar el efecto antimicrobiano del carvacrol sobre el *biofilm*. En todos los ensayos se incorporó un control negativo (pocillo sin carvacrol) para el tampón de pH 4,0 y el de pH 7,0 para conocer el efecto del pH sobre el *biofilm*.

4.6. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Los resultados mostrados en este trabajo se obtuvieron como mínimo por triplicado en todos los experimentos. Todos los experimentos se realizaron de forma independiente y a partir de cultivos bacterianos diferentes obtenidos bajo las mismas condiciones.

Se utilizó el software GraphPad Prism® 7 (GraphPad Inc, San Diego, Estados Unidos) para determinar tanto los promedios y las desviaciones estándar de los resultados como para su representación gráfica. Por otro lado, para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos parámetros se realizó un análisis *one-way* ANOVA. La diferencia estadísticamente significativa se consideró cuando el valor $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Formación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1

Como paso previo a los estudios de eliminación, se evaluó la capacidad de *Pseudomonas* sp. SP1 de formar *biofilms*. Como puede observarse en la Figura 5.1 esta cepa formó un *biofilm* en la interfase aire-líquido adherido a los bordes del pocillo. Se observó que *Pseudomonas* sp. SP1 formaba un *biofilm* en forma de película que cubría toda la superficie del pocillo. Fernández-Gómez *et al.* (2021) observaron la capacidad de cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas en la industria cárnica de formar *biofilms* en superficies de poliestireno y/o acero inoxidable, de la misma manera que la cepa utilizada en este trabajo demostró una clara capacidad para formarlos. A las 24 h de incubación, el *biofilm* comenzó teniendo un aspecto liso y uniforme, pero a partir de las 48 h se hizo más grueso y empezó a mostrar arrugas y pliegues. Este comportamiento es típico de los *biofilms* que crecen sobre una interfase aire-líquido y además están confinados en un recipiente, tal como observan Trejo *et al.* (2013). Según este estudio, el *biofilm* se comporta como una fina película polimérica elástica que se arruga cuando se aplica una fuerza de compresión sobre sus bordes. El *biofilm* no deja de crecer, de expandirse, y las paredes del pocillo ejercen una resistencia que provoca que éste se arrugue y, posteriormente, se pliegue.

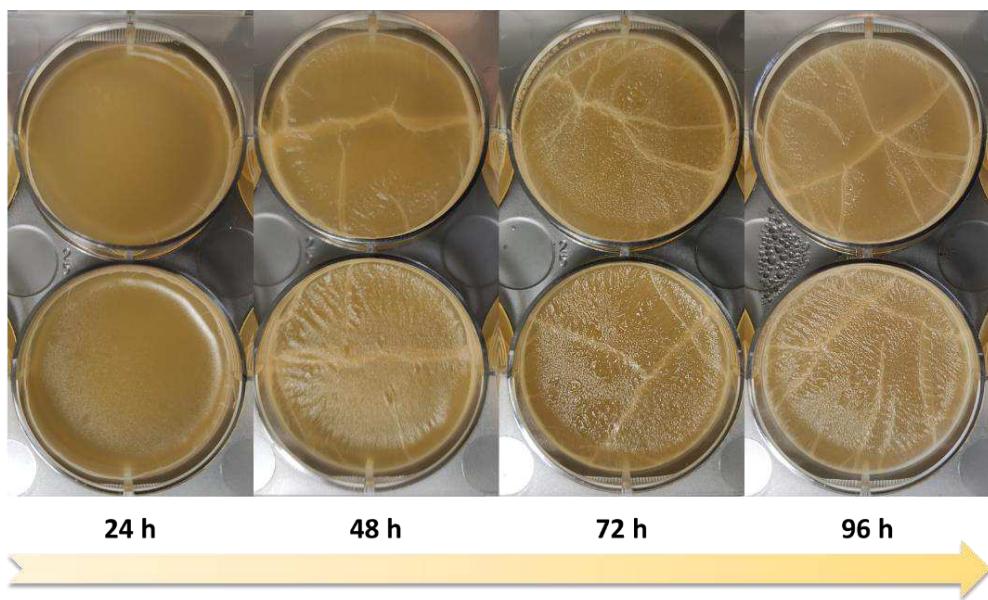


Figura 5.1. Aspecto del *biofilm* de *Pseudomonas* sp. SP1 a lo largo del tiempo (24, 48, 72 y 96 h) formado en placas de 6 pocillos de poliestireno.

Estos resultados permitieron determinar que *Pseudomonas* sp. SP1 es una gran formadora de *biofilms* al tardar solo 24 h en formar una película visible sobre la interfase aire-líquido y seguir aumentando su tamaño durante las 72 h siguientes formando una película cada vez más gruesa y con mayores arrugas y pliegues.

5.1.1. Cuantificación de la formación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1

Con objeto de describir el *biofilm* formado por *Pseudomonas* sp. SP1, se determinó la medida de densidad óptica a 595 nm (DO_{595}) y el recuento de células sésiles a lo largo del tiempo de incubación a 25 °C (24-96 h) (Figura 5.2).

La biomasa del *biofilm*, evaluada a través de DO_{595} , aumentó de manera estadísticamente significativa a las 48 h ($p < 0,05$), alcanzando valores 1,4 veces mayores con relación a las 24 h y manteniéndose estable a lo largo de las 72 y 96 h (Figura 5.2.A). Sin embargo, los recuentos se mantuvieron constantes desde las 24 hasta las 72 h con un valor por encima de 10^9 UFC/mL, mientras que a las 96 h se observó una disminución significativa del recuento respecto al de las 48 y 72 h ($p < 0,05$), descendiendo hasta $5,0 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 5.2.B). Ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos a las 24, 48 y 72 h ($p > 0,05$), se determinó el pico de formación máximo a las 72 h, con $2,0 \times 10^9$ UFC/mL. Tras este tiempo de incubación, se trata de un *biofilm* más maduro y, por tanto, resulta más adecuado, por su potencial mayor resistencia, para realizar los posteriores ensayos de eliminación.

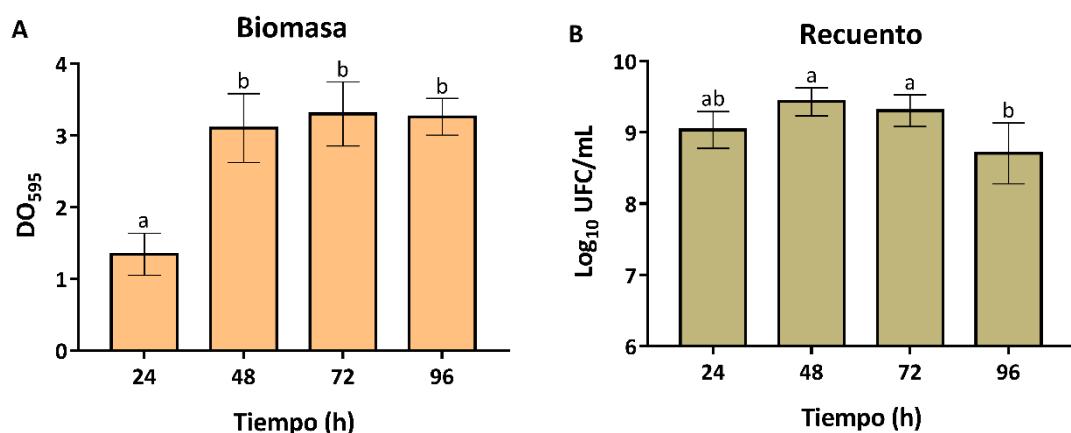


Figura 5.2. Evolución de la biomasa evaluada por densidad óptica a 595 nm (A) y del recuento de las células sésiles (B) de los *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1 a lo largo del tiempo (24, 48, 72 y 96 h). Las barras de error muestran la desviación estándar de las réplicas. Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La variación de los recuentos de células sésiles, con un aumento hasta las 48 h y una disminución a las 96 h, difiere de lo observado en el estudio de Wang *et al.* (2018) con una cepa de *P. fluorescens*, en el que se alcanzó el recuento máximo a las 96 h, se mantuvo estable hasta las 120 h y disminuyó a lo largo de las 48 h siguientes. Por el contrario, en un estudio de otros autores (Wang *et al.*, 2020) sí se observó el recuento máximo a las 24 h y se mantuvo estable hasta las 48 h, que fue el fin del ensayo. En cuanto a lo observado por otros investigadores para *P. aeruginosa*, Akinbobola *et al.* (2017) observaron que el recuento del *biofilm* aumentaba constantemente hasta las 192 h, de la misma manera que lo hacía la biomasa, difiriendo ampliamente con lo observado en este trabajo. Este comportamiento observado por Akinbobola *et al.* (2017) podría deberse a que en su estudio se renovaba el medio de cultivo cada 24 h. Para otras especies formadoras de *biofilms* de *Pseudomonas* spp., se han observado evoluciones diferentes de la biomasa, por ejemplo, G. Wang *et al.* (2021) observaron un máximo a las 12 h y un descenso progresivo hasta las 48 h para *P. fragi*; y Liu *et al.* (2021) un máximo a las 22 h y un descenso hasta las 54 h para *P. putida*.

Estos resultados permitieron establecer las 72 h como periodo más adecuado de formación del *biofilm* de la cepa sobre el que luego se realizarían los ensayos de eliminación con carvacrol.

5.2. Eliminación de *biofilms* de *Pseudomonas* sp. SP1 mediante el uso de carvacrol

5.2.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Con objeto de evaluar la resistencia de *Pseudomonas* sp. SP1 al carvacrol, se determinó la CMI y CMB de este compuesto sobre células planctónicas. Esta determinación sirvió como valor de referencia para establecer las condiciones de los ensayos de eliminación de *biofilms* posteriores. Los valores de CMI y CMB determinados en este trabajo y los determinados en otros estudios para especies de *Pseudomonas* spp. y para otros microorganismos se encuentran recogidos en la Tabla 5.1.

Los valores de CMI y CMB de carvacrol sobre las células planctónicas de *Pseudomonas* sp. SP1 que se obtuvieron fueron 400 y 800 µL/L, respectivamente. En este sentido, la CMI de carvacrol que se obtuvo resultó similar a las determinadas por otros autores para *P. fluorescens* (320, 370 y 246 µL/L) (Zhang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Y. Wang *et al.*, 2021). En esta misma línea, Ashrafudoulla *et al.* (2021) determinaron una CMI de carvacrol frente a *P. aeruginosa* de 300 µL/L, aunque también determinaron una CMB algo inferior a la descrita en este trabajo (500 µL/L). Sin embargo, en otros estudios, como los de Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) y Ghaderi *et al.*

(2021) se determinó una CMI muy superior a la determinada en este trabajo, recogiendo valores de 1.215 y 65.506 µL/L, respectivamente, para *P. aeruginosa*. Además, Tapia-Rodriguez *et al.* (2017) también determinaron una CMB de 2.306 µL/L.

Otras bacterias dentro del grupo de las Gram negativas parecen tener, por lo general, unos valores de CMI similares, pero valores de CMB inferiores (Tabla 5.1), por ejemplo, se han descrito para *Escherichia coli* valores de CMI de 200 y 154 µL/L (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011; Chueca *et al.*, 2016; Espina *et al.*, 2017; López-Miranda *et al.*, 2021) y de CMB de 200 y 205 µL/L (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011; López-Miranda *et al.*, 2021); y para diferentes cepas de *Salmonella* spp. CMI de 262, 156 y 200 µL/L y CMB de 524, 313 y 200 µL/L (Miladi *et al.*, 2017; Čabarkapa *et al.*, 2019; Berdejo *et al.*, 2020). Por otro lado, dentro de las Gram positivas, se observa, igual que con las Gram negativas, valores similares de CMI y valores inferiores de CMB, por ejemplo, Espina *et al.* (2017) observaron para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* una CMI de 200 µL/L; y otros estudios con *S. aureus* presentan valores de CMI de 100, 246 y 205 µL/L (Berdejo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; López-Miranda *et al.*, 2021) y de CMB de 256 µL/L (López-Miranda *et al.*, 2021). Aunque, a diferencia de los estudios anteriores, dos Santos Rodrigues *et al.* (2017) observaron un valor de CMI seis veces más alto para *S. aureus* que el observado en este trabajo para *Pseudomonas* sp. SP1.

La CMI de carvacrol obtenida para *Pseudomonas* sp. SP1 resulta, en general, similar comparada con las de los microorganismos comentados anteriormente para el mismo compuesto. Sin embargo, la CMB resulta, generalmente, superior a las observadas en otras especies. Así, en *E. coli* (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011; López-Miranda *et al.*, 2021) o *S. aureus* (López-Miranda *et al.*, 2021), se observa una relación CMB/CMI cercana a 1,0 (Tabla 5.1), es decir, sus valores de CMI y CMB se encuentran próximos, sugiriendo que la resistencia de la especie a la inhibición y a la inactivación es similar. Sin embargo, en *Pseudomonas* sp. SP1 se observó una relación CMB/CMI 2 veces superior. De este modo, *Pseudomonas* sp. SP1 presentaría una resistencia al carvacrol similar a las otras especies, pero tanto su mayor valor de CMB como su mayor diferencia entre CMI y CMB sugieren que, potencialmente, resultaría más difícil de erradicar que las otras especies.

Esta determinación de la resistencia de *Pseudomonas* sp. SP1 al carvacrol permitió disponer de un valor de referencia para establecer la concentración de antimicrobiano que se usaría en los posteriores ensayos de eliminación de *biofilms*.

Tabla 5.1. Valores de CMI y CMB de carvacrol determinados para *Pseudomonas* sp. SP1 y para otras especies microbianas.

Microorganismo	CMI	CMB	Relación (CMB/CMI)	Referencia ¹
<i>Pseudomonas</i> sp. SP1	400	800	2,0	Este trabajo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	320	-	-	Zhang <i>et al.</i> (2018)
	370	-	-	Wang <i>et al.</i> (2020)
	246	-	-	Y. Wang <i>et al.</i> (2021)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.215	2.306	1,9	Tapia-Rodriguez <i>et al.</i> (2017)
	65.506	-	-	Ghaderi <i>et al.</i> (2021)
	300	500	1,7	Ashrafudoulla <i>et al.</i> (2021)
<i>Escherichia coli</i>	200	200	1,0	Ait-Ouazzou <i>et al.</i> (2011)
	200	-	-	Chueca <i>et al.</i> (2016)
	200	-	-	Espina <i>et al.</i> (2017)
	154	205	1,3	López-Miranda <i>et al.</i> (2021)
<i>Salmonella</i> spp.	262	524	2,0	Miladi <i>et al.</i> (2017)
	156	313	2,0	Čabarkapa <i>et al.</i> (2019)
	200	200	1,0	Berdejo <i>et al.</i> (2020)
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	-	-	Espina <i>et al.</i> (2017)
	2.500	-	-	dos Santos Rodrigues <i>et al.</i> (2017)
	100	-	-	Berdejo <i>et al.</i> (2019)
	246	-	-	Wang <i>et al.</i> (2020)
	205	256	1,2	López-Miranda <i>et al.</i> (2021)
<i>Listeria monocytogenes</i>	200	-	-	Espina <i>et al.</i> (2017)

¹ Las referencias están ordenadas cronológicamente para cada microorganismo.

5.2.2. Eliminación del biofilm de *Pseudomonas* sp. SP1

Los ensayos de eliminación se realizaron con el *biofilm* de *Pseudomonas* sp. SP1 en su punto máximo de maduración, es decir, tras 72 h de incubación. En la Figura 5.3 se representa la reducción de biomasa, tras la incubación del *biofilm* de 72 h de *Pseudomonas* sp. SP1 a 25 °C durante 1 h en ausencia y en presencia de carvacrol (2,5x CMB: 2.000 µL/L) en tampones de pH 4,0 y pH 7,0.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la reducción de biomasa que se observó al incubar los *biofilms* a ambos pH en ausencia de carvacrol ($p < 0,05$). De igual manera, se encontraron diferencias significativas entre las incubaciones a ambos pH en presencia de antimicrobiano. Tanto en presencia como ausencia de carvacrol, se alcanzaron reducciones de biomasa mayores a pH 7,0 que a pH 4,0.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento a pH 4,0 tanto en ausencia como en presencia de carvacrol ($p > 0,05$), alcanzando una disminución de la biomasa menor al 10 %. De la misma manera, no se observaron diferencias significativas cuando se utilizó el tampón de pH 7,0 en ausencia y en presencia de antimicrobiano, alcanzando valores superiores al 30 % de eliminación de la biomasa inicial.

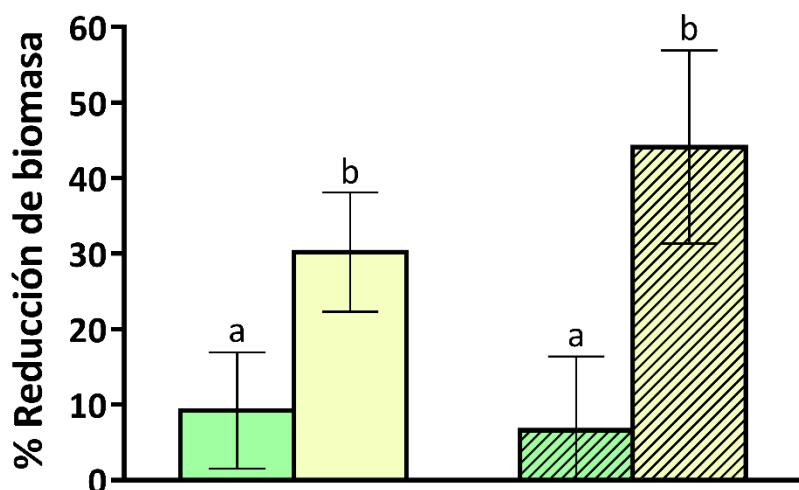


Figura 5.3. Reducción de biomasa (%) respecto del control (*biofilm* a las 72 h sin tratamiento) en los *biofilms* de 72 h de *Pseudomonas* sp. SP1 tras incubación a 25 °C/1 h en ausencia de carvacrol a pH 4,0 (■) y pH 7,0 (□); y con 2,5x la CMB (2.000 µL/L) de carvacrol a pH 4,0 (▨) y pH 7,0 (▨). Las barras de error muestran la desviación estándar de las réplicas. Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

El tratamiento de eliminación puede favorecer la retirada mecánica o arrastre de la biomasa del *biofilm*. Otros estudios han determinado que el agua electrolizada a pH ácido es eficaz a la hora de retirar *biofilms* de algunas bacterias, aunque también se observó que es eficaz a pH neutro y que a pH básico tiene incluso mayor capacidad de retirar *biofilms* que a pH ácido, a pesar de mostrar menor efecto bactericida (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019). Čabarkapa *et al.* (2019) observaron en dos cepas de *Salmonella* spp. una reducción del 50 y 80 % de la biomasa tras incubar *biofilms* de 48 h a temperatura ambiente durante 1 h con 624 µL/L de carvacrol, lo cual podría deberse a la menor resistencia de las cepas al carvacrol (menor CMI y CMB) respecto a *Pseudomonas* sp. SP1.

La disminución de la biomasa del *biofilm* por sí sola no asegura la higiene de la superficie a la que está adherido, ya que resulta muy importante, además, inactivar las células sésiles restantes. La eliminación de un 90 % de la biomasa del *biofilm* solo reduciría la carga microbiana inicial en un ciclo logarítmico. Por lo tanto, en este caso, la máxima reducción de biomasa observada en este trabajo (44,1 %), solo conseguiría una reducción de 0,25 ciclos logarítmicos de la población inicial de *Pseudomonas* sp. SP1. Sin embargo, es posible que el tratamiento aplicado no sólo consiga eliminar mecánicamente la biomasa del *biofilm*, sino que también pueda inactivar las células sésiles que forman parte del *biofilm* no eliminado. En la Figura 5.4 se recogen los recuentos de células sésiles obtenidos tras los ensayos de eliminación en ausencia y en presencia de carvacrol (2,5x CMB: 2.000 µL/L) en tampones de pH 4,0 y pH 7,0. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos obtenidos tras los tratamientos a ambos pH en ausencia de carvacrol ($p < 0,05$). También se observó una disminución significativa de los recuentos de células sésiles por acción del pH 4,0 en ausencia de antimicrobiano de 1,65 ciclos logarítmicos respecto del control ($p < 0,05$). Este tratamiento fue más efectivo que el de pH 7,0 en ausencia de carvacrol, donde no se observó una reducción significativa respecto del control ($p > 0,05$).

Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a ambos pH con adición de carvacrol. Así, aunque la incubación a pH 7,0 en ausencia de carvacrol no redujo de manera significativa el recuento, la adición del antimicrobiano al tampón de pH neutro potenció el efecto letal resultando en una reducción de 4,52 ciclos logarítmicos de la población inicial de células sésiles. De la misma manera, cuando se adicionó carvacrol a pH 4,0 se potenció el efecto letal y se consiguieron disminuir más de 5 ciclos logarítmicos la población microbiana del *biofilm*, es decir, una inactivación de más del 99,999 % de la población inicial.

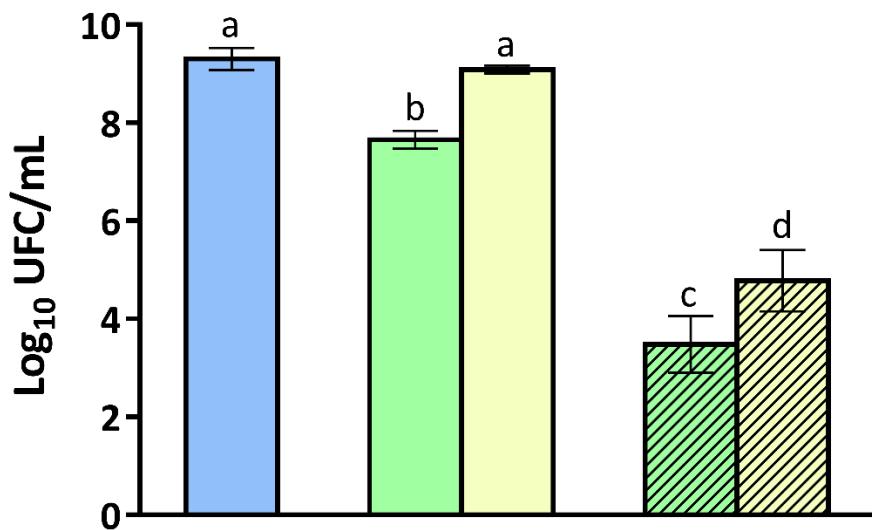


Figura 5.4. Recuentos de células sésiles obtenidos en los *biofilms* de 72 h de *Pseudomonas* sp. SP1 tras incubación a 25 °C/1 h en ausencia de carvacrol a pH 4,0 (■) y pH 7,0 (□); y con 2,5x la CMB (2.000 µL/L) de carvacrol a pH 4,0 (▨) y pH 7,0 (▨), con respecto al recuento del control (*biofilm* a las 72 h sin tratamiento ■). Las barras de error muestran la desviación estándar de las réplicas. Las letras diferentes sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En ambos tratamientos (en presencia y ausencia carvacrol) se observó una mayor inactivación celular a pH 4,0 que a pH 7,0, efecto contrario al observado en la reducción de biomasa del *biofilm*, donde el tratamiento a pH neutro consiguió una mayor reducción que el de pH ácido.

No existen muchos estudios que evalúen la eficacia del carvacrol para la eliminación de *biofilms* de *Pseudomonas* spp. Por ejemplo, Ashrafudoulla *et al.* (2021) obtuvieron resultados similares a pH neutro con una menor cantidad de antimicrobiano al conseguir una reducción de 4,79 ciclos logarítmicos en un *biofilm* de 24 h de *P. aeruginosa* tras una incubación a 30 °C/10 min con 600 µL/L de carvacrol. La menor resistencia al carvacrol (menores CMI y CMB que *Pseudomonas* sp. SP1) de la cepa utilizada y la evaluación del efecto letal sobre un *biofilm* menos maduro que el de este trabajo, podrían estar relacionadas con la mayor eficacia observada por Ashrafudoulla *et al.* (2021). Por otro lado, Campana y Baffone (2018) evaluaron la eficacia de un tratamiento a temperatura ambiente durante 5 min con 10.000 µL/L de carvacrol sobre un *biofilm* de 96 h de *P. aeruginosa*. En este caso, se consiguió una reducción de más de 6,5 ciclos logarítmicos hasta estar por debajo del límite de detección (10^1 UFC/cm²)

debido posiblemente a la mayor sensibilidad de la cepa y/o a la concentración de carvacrol utilizada, cinco veces mayor que la utilizada en este trabajo.

Otros autores han llevado a cabo estudios de eliminación con carvacrol de *biofilms* de otras especies. Espina *et al.* (2017) incubaron *biofilms* de 72 h de *E. coli* y de *S. aureus* a 37 °C/1 h con 1.000 µL/L de carvacrol y de *L. monocytogenes* con 2.000 µL/L y observaron una reducción de 5 ciclos logarítmicos en los recuentos de células sésiles de las tres especies microbianas. Esto puede deberse a que estas especies eran algo más sensibles al carvacrol que *Pseudomonas* sp. SP1, pues presentaban valores de CMI algo inferiores, y/o a la mayor temperatura de aplicación del carvacrol.

En conclusión, se ha podido observar que el tratamiento con 2.000 µL/L de carvacrol a pH 4,0 no elimina una proporción relevante de la biomasa del *biofilm* de 72 h formado por *Pseudomonas* sp. SP1, pero inactiva una gran parte de su población. A pesar de que el mismo tratamiento a pH 7,0 provoca menor inactivación de las células sésiles, elimina una gran proporción de su biomasa. Así, si el objetivo de un tratamiento de eliminación es conseguir la retirada mecánica del *biofilm* y la inactivación celular, se podría realizar una primera aplicación a pH 7,0 que retirara parte de la biomasa y después una aplicación a pH 4,0 para inactivar las células sésiles del *biofilm* restante. Para definir estos tratamientos sería necesario que se llevaran a cabo estudios sobre la aplicación de tratamientos de eliminación sucesivos y sobre los mecanismos de adaptación al estrés de las células de *Pseudomonas* sp. SP1.

6. CONCLUSIONES

A continuación, se describen las principales conclusiones obtenidas tras la realización de este Trabajo de Fin de Grado:

- *Pseudomonas* sp. SP1, una cepa aislada de contramuslos de pollo deshuesados sin piel, es una gran formadora de *biofilms* en superficies de poliestireno.
- Esta cepa forma un *biofilm* visible sobre una interfase aire-líquido en forma de película tras 24 h a 25 °C.
- Los *biofilms* de esta cepa alcanzan un recuento máximo de células sésiles a las 24 h (por encima de 10^9 UFC/mL), sin embargo, la cantidad de biomasa no alcanza el máximo hasta las 48 h y se mantiene constante a pesar de que el recuento desciende a las 96 h. De esta manera, el *biofilm* alcanza su punto máximo de maduración a las 72 h ($2,0 \times 10^9$ UFC/mL).
- Esta cepa presenta una CMI y CMB de carvacrol de 400 y 800 µL/L, respectivamente, por lo que presenta una resistencia a este antimicrobiano similar a otras bacterias Gram negativas y positivas.
- El tratamiento a 25 °C/1 h/pH 7,0 con 2.000 µL/L de carvacrol (2,5x CMB) sobre un *biofilm* de 72 h de *Pseudomonas* sp. SP1 elimina un 44,1 % de la biomasa inicial del *biofilm*.
- El tratamiento a 25 °C/1 h/pH 4,0 con 2.000 µL/L de carvacrol (2,5x CMB) sobre un *biofilm* de 72 h consigue una inactivación de más de 5 ciclos logarítmicos en los recuentos de células sésiles de *Pseudomonas* sp. SP1.

CONCLUSIONS

The main conclusions derived from the realization of this Final Project are presented afterwards:

- *Pseudomonas* sp. SP1, a strain isolated from peeled boneless poultry leg quarters, is a great biofilm producer in polystyrene surfaces.
- This strain produces a visible pellicle biofilm at the air-liquid interface after 24 h at 25 °C.
- Biofilms of this strain reach a sessile cell growth maximum at 24 h (above 10^9 CFU/mL), however, biomass does not reach the maximum until 48 h and remains constant even though the count decreases at 96 h. In this way, the biofilm reaches its maturation maximum at 72 h (2.0×10^9 CFU/mL).
- This strain shows a MIC and MBC of carvacrol of 400 and 800 µL/L, respectively, so it has similar resistance to this antimicrobial as other Gram negative and positive bacteria.
- The treatment of 25 °C/1 h/pH 7.0 with 2,000 µL/L of carvacrol (2.5x MBC) on a 72 h biofilm eliminates a 44.1 % of the initial biomass of the biofilm of *Pseudomonas* sp. SP1.
- The treatment of 25 °C/1 h/pH 4.0 with 2,000 µL/L of carvacrol (2.5x MBC) on a 72 h biofilm achieves an inactivation of more than 5 logarithmic cycles of the number of sessile cells in *Pseudomonas* sp. SP1.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización del Trabajo de Fin de Grado permite desarrollar las capacidades de organización autónoma del tiempo y del trabajo, toma de decisiones y puesta en práctica de gran parte de las competencias transversales adquiridas durante la titulación.

A lo largo de la titulación, la microbiología es una rama que se trata de manera amplia, y suele centrarse en el estudio de los microorganismos como unidades independientes, no formando comunidades microbianas (*biofilms*), tal y como se encuentran muchas veces en la naturaleza e industria alimentaria. La realización de este Trabajo de Fin de Grado me ha permitido documentarme exhaustivamente acerca de esta forma de vida y de las implicaciones higiénicas que tiene para la industria alimentaria, así como de la capacidad antimicrobiana y de eliminación de *biofilms* de algunos compuestos antimicrobianos procedentes de especies vegetales.

Por otra parte, he logrado alcanzar un mayor desarrollo en las siguientes competencias debido a la realización de este Trabajo de Fin de Grado:

- Buscar, analizar y sintetizar información acerca de temas de microbiología y tecnología.
- 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, realizar y representar resultados de forma correcta para extraer conclusiones veraces y fiables.
- Elaborar y emitir informes técnicos en español e inglés.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C. and Pagán, R. (2011) "The Antimicrobial Activity of Hydrophobic Essential Oil Constituents Acting Alone or in Combined Processes of Food Preservation," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3), pp. 320–329. doi:10.1016/J.IFSET.2011.04.004.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Gelaw, T.K., Lamo-Castellví, S. de, Pagán, R. and García-Gonzalo, D. (2013) "New Insights in Mechanisms of Bacterial Inactivation by Carvacrol," *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), pp. 173–185. doi:10.1111/JAM.12028.
- Akinbobola, A.B., Sherry, L., Mckay, W.G., Ramage, G. and Williams, C. (2017) "Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro Biofilms to High-Level Peracetic Acid Disinfection," *Journal of Hospital Infection*, 97(2), pp. 162–168. doi:10.1016/J.JHIN.2017.06.024.
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L.M., Briandet, R. and Cotter, P.D. (2019) "Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities," *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, pp. 173–195. doi:10.1146/annurev-food-032818-121805.
- Andreani, N.A. and Fasolato, L. (2017) "*Pseudomonas* and Related Genera," in Bevilacqua, A., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M. (eds) *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Duxford: Woodhead Publishing, pp. 25–59. doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00005-4.
- Ashrafudoulla, M., Rahaman Mizan, M.F., Park, S.H. and Ha, S.D. (2021) "Antibiofilm Activity of Carvacrol against *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm on MBEC™ Biofilm Device and Polypropylene Surface," *LWT*, 147, p. 111575. doi:10.1016/J.LWT.2021.111575.
- Bautista, D.A. (2014) "Spoilage Problems: Problems Caused by Bacteria," in Batt, C.A. and Tortorello, M.L. (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3 (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 465–470. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00314-1.
- Berdejo, D., Chueca, B., Pagán, E., Renzoni, A., Kelley, W.L., Pagán, R. and Garcia-Gonzalo, D. (2019) "Sub-Inhibitory Doses of Individual Constituents of Essential Oils Can Select for *Staphylococcus aureus* Resistant Mutants," *Molecules*, 24(1), p. 170. doi:10.3390/MOLECULES24010170.
- Berdejo, D., Merino, N., Pagán, E., García-Gonzalo, D. and Pagán, R. (2020) "Genetic Variants and Phenotypic Characteristics of *Salmonella* Typhimurium-Resistant Mutants after Exposure to Carvacrol," *Microorganisms*, 8(6), p. 937. doi:10.3390/MICROORGANISMS8060937.

Blackburn, C.D.W. (2006) "Introduction," in Blackburn, C.D.W. (ed.) *Food Spoilage Microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing, pp. xvii–xxiii. doi:10.1016/B978-1-85573-966-6.50027-4.

Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D. and Pezo, L. (2019) "Anti-Biofilm Activities of Essential Oils Rich in Carvacrol and Thymol against *Salmonella Enteritidis*," *Biofouling*, 35(3), pp. 361–375. doi:10.1080/08927014.2019.1610169.

Campana, R. and Baffone, W. (2018) "Carvacrol Efficacy in Reducing Microbial Biofilms on Stainless Steel and in Limiting Re-Growth of Injured Cells," *Food Control*, 90, pp. 10–17. doi:10.1016/J.FOODCONT.2018.02.029.

Chaichi, M., Mohammadi, A., Badii, F. and Hashemi, M. (2021) "Triple Synergistic Essential Oils Prevent Pathogenic and Spoilage Bacteria Growth in the Refrigerated Chicken Breast Meat," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, p. 101926. doi:10.1016/J.BCAB.2021.101926.

Chen, K., Zhang, M., Bhandari, B. and Mujumdar, A.S. (2021) "Edible Flower Essential Oils: A Review of Chemical Compositions, Bioactivities, Safety and Applications in Food Preservation," *Food Research International*, 139, p. 109809. doi:10.1016/J.FOODRES.2020.109809.

Chueca, B., Berdejo, D., Gomes-Neto, N.J., Pagán, R. and García-Gonzalo, D. (2016) "Emergence of Hyper-Resistant *Escherichia coli* MG1655 Derivative Strains after Applying Sub-Inhibitory Doses of Individual Constituents of Essential Oils," *Frontiers in Microbiology*, 7, p. 273. doi:10.3389/FMICB.2016.00273.

Dodd, C.E.R. (2014) "Pseudomonas: Introduction," in Batt, C.A. and Tortorello, M.L. (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3 (Second Edition)*. Oxford: Academic Press, pp. 244–247. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00282-2.

Espina, L., Berdejo, D., Alfonso, P., García-Gonzalo, D. and Pagán, R. (2017) "Potential Use of Carvacrol and Citral to Inactivate Biofilm Cells and Eliminate Biofouling," *Food Control*, 82, pp. 256–265. doi:10.1016/J.FOODCONT.2017.07.007.

Espina, L., Pagán, R., López, D. and García-Gonzalo, D. (2015) "Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*," *Molecules*, 20(6), pp. 11357–11372. doi:10.3390/MOLECULES200611357.

Fernández-Gómez, P., Figueredo, A., López, M., González-Raurich, M., Prieto, M. and Alvarez-Ordóñez, A. (2021) "Heterogeneity in Biofilm Formation and Identification of Biomarkers of Strong Biofilm Formation among Field Isolates of *Pseudomonas* spp.," *Food Research International*, 148, p. 110618. doi:10.1016/J.FOODRES.2021.110618.

Fernández-Gómez, P., Prieto, M., Fernández-Escámez, P.S., López, M. and Alvarez-Ordóñez, A. (2020) "Biopolímeras y Persistencia Microbiana en la Industria Alimentaria," *Arbor*, 196(795), p. a538. doi:10.3989/ARBOR.2020.795N1002.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A. and Kjelleberg, S. (2016) "Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life," *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), pp. 563–575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94.

Flemming, H.C. and Wuertz, S. (2019) "Bacteria and Archaea on Earth and their Abundance in Biofilms," *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), pp. 247–260. doi:10.1038/s41579-019-0158-9.

Fysun, O., Kern, H., Wilke, B. and Langowski, H.C. (2019) "Evaluation of Factors Influencing Dairy Biofilm Formation in Filling Hoses of Food-Processing Equipment," *Food and Bioproducts Processing*, 113, pp. 39–48. doi:10.1016/j.fbp.2018.10.009.

Ghaderi, L., Aliahmadi, A., Ebrahimi, S.N. and Rafati, H. (2021) "Effective Inhibition and Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by *Satureja khuzistanica* Essential Oil Nanoemulsion," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, p. 102260. doi:10.1016/J.JDDST.2020.102260.

Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrød, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S. and Nychas, G.J. (2014) "Attachment and Biofilm Formation by Foodborne Bacteria in Meat Processing Environments: Causes, Implications, Role of Bacterial Interactions and Control by Alternative Novel Methods," *Meat Science*, 97(3), pp. 298–309. doi:10.1016/J.MEATSCI.2013.05.023.

González-Rivas, F., Riolles-Avila, C., Fontecha-Umaña, F., Ríos-Castillo, A.G. and Rodríguez-Jerez, J.J. (2018) "Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), pp. 1261–1276. doi:10.1111/1541-4337.12378.

Húngaro, H.M., Caturla, M.Y.R., Horita, C.N., Furtado, M.M. and Sant'Ana, A.S. (2016) "Blown Pack Spoilage in Vacuum-Packaged Meat: A Review on Clostridia as Causative Agents, Sources, Detection Methods, Contributing Factors and Mitigation Strategies," *Trends in Food Science & Technology*, 52, pp. 123–138. doi:10.1016/J.TIFS.2016.04.010.

Kakurinov, V. (2014) "Food Safety Assurance Systems: Cleaning and Disinfection," in Motarjem, Y., Moy, G.G., and Todd, E.C.D. (eds) *Encyclopedia of Food Safety, Volume 4*. San Diego: Academic Press, pp. 211–225. doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00356-5.

Katiyo, W., de Kock, H.L., Coorey, R. and Buys, E.M. (2020) "Sensory Implications of Chicken Meat Spoilage in Relation to Microbial and Physicochemical Characteristics during Refrigerated Storage," *LWT*, 128, p. 109468. doi:10.1016/J.LWT.2020.109468.

Kavanaugh, N.L. and Ribbeck, K. (2012) "Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms," *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), pp. 4057–4061. doi:10.1128/AEM.07499-11.

Kreyenschmidt, J. and Ibalid, R. (2012) "Modeling shelf life using microbial indicators," in Nicoli, M.C. (ed.) *Shelf Life Assessment of Food*. Boca Raton: CRC Press, pp. 127–168. Available at: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/mono/10.1201/b11871-9/modeling-shelf-life-using-microbial-indicators-maria-cristina-nicoli?context=ubx&refId=8ad5cefe-52ac-424e-a7de-4156b9280419> (Accessed: August 25, 2021).

Lallemand, E.A., Lacroix, M.Z., Toutain, P.L., Boullier, S., Ferran, A.A. and Bousquet-Melou, A. (2016) "In vitro Degradation of Antimicrobials during Use of Broth Microdilution Method Can Increase the Measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations," *Frontiers in Microbiology*, 7(1), p. 2051. doi:10.3389/FMICB.2016.02051.

Lira, M.C., Rodrigues, J.B., Almeida, E.T.C., Ritter, A.C., Tondo, E., Torres, S.M., Schaffner, D., de Souza, E.L. and Magnani, M. (2020) "Efficacy of Oregano and Rosemary Essential Oils to Affect Morphology and Membrane Functions of Noncultivable Sessile Cells of *Salmonella Enteritidis* 86 in Biofilms Formed on Stainless Steel," *Journal of Applied Microbiology*, 128(2), pp. 376–386. doi:10.1111/JAM.14423.

Liu, H., Li, S., Xie, X. and Shi, Q. (2021) "*Pseudomonas putida* Actively Forms Biofilms to Protect the Population under Antibiotic Stress," *Environmental Pollution*, 270, p. 116261. doi:10.1016/J.ENVPOL.2020.116261.

López-Miranda, S., Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D. and Pagán, R. (2021) "Modified Cyclodextrin Type and Dehydration Methods Exert a Significant Effect on the Antimicrobial Activity of Encapsulated Carvacrol and Thymol," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), pp. 3827–3835. doi:10.1002/JSCFA.11017.

Marinelli, L., di Stefano, A. and Cacciatore, I. (2018) "Carvacrol and its Derivatives as Antibacterial Agents," *Phytochemistry Reviews*, 17, pp. 903–921. doi:10.1007/S11101-018-9569-X.

Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. and Chaieb, K. (2017) "Use of Carvacrol, Thymol, and Eugenol for Biofilm Eradication and Resistance Modifying

Susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Strains to Nalidixic Acid," *Microbial Pathogenesis*, 104, pp. 56–63. doi:10.1016/J.MICPATH.2017.01.012.

Mohareb, F., Iriondo, M., Doulgeraki, A.I., van Hoek, A., Aarts, H., Cauchi, M. and Nychas, G.J.E. (2015) "Identification of Meat Spoilage Gene Biomarkers in *Pseudomonas putida* Using Gene Profiling," *Food Control*, 57, pp. 152–160. doi:10.1016/J.FOODCONT.2015.04.007.

Morales, P.A., Aguirre, J.S., Troncoso, M.R. and Figueroa, G.O. (2016) "Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Present in Spoiled Poultry Fillets Sold in Retail Settings," *LWT*, 73, pp. 609–614. doi:10.1016/J.LWT.2016.06.064.

Odeyemi, O.A., Alegbeleye, O.O., Strateva, M. and Stratev, D. (2020) "Understanding Spoilage Microbial Community and Spoilage Mechanisms in Foods of Animal Origin," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), pp. 311–331. doi:10.1111/1541-4337.12526.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) "Biofilm Formation as Microbial Development," *Annual Review of Microbiology*, 54, pp. 49–79. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.54.1.49.

Petruzzi, L., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. (2017) "Microbial Spoilage of Foods: Fundamentals," in Bevilacqua, A., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M. (eds) *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers*. Duxford: Woodhead Publishing, pp. 1–21. doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9.

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Anniballi, F., Valbonetti, L. and Paparella, A. (2018) "Effect of *Origanum vulgare* Essential Oil on Biofilm Formation and Motility Capacity of *Pseudomonas fluorescens* Strains Isolated from Discoloured Mozzarella Cheese," *Journal of Applied Microbiology*, 124(5), pp. 1220–1231. doi:10.1111/JAM.13707.

Sadekuzzaman, M., Mizan, M.F.R., Kim, H.S., Yang, S. and Ha, S. do (2018) "Activity of Thyme and Tea Tree Essential Oils against Selected Foodborne Pathogens in Biofilms on Abiotic Surfaces," *LWT*, 89, pp. 134–139. doi:10.1016/J.LWT.2017.10.042.

dos Santos Rodrigues, J.B., de Carvalho, R.J., de Souza, N.T., de Sousa Oliveira, K., Franco, O.L., Schaffner, D., de Souza, E.L. and Magnani, M. (2017) "Effects of Oregano Essential Oil and Carvacrol on Biofilms of *Staphylococcus aureus* from Food-Contact Surfaces," *Food Control*, 73, pp. 1237–1246. doi:10.1016/J.FOODCONT.2016.10.043.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002) "*Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm," *Journal of Bacteriology*, 184(4), pp. 1140–1154. doi:10.1128/JB.184.4.1140-1154.2002.

Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J. (2010) "A Review of Current and Emergent Biofilm Control Strategies," *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), pp. 573–583. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008.

Soni, K.A., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Silva, J.L., Mikel, B. and Bailey, R.H. (2013) "Inhibition and Inactivation of *Salmonella* Typhimurium Biofilms from Polystyrene and Stainless Steel Surfaces by Essential Oils and Phenolic Constituent Carvacrol," *Journal of Food Protection*, 76(2), pp. 205–212. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-196.

Srey, S., Jahid, I.K. and Ha, S.D. (2013) "Biofilm Formation in Food Industries: A Food Safety Concern," *Food Control*, 31(2), pp. 572–585. doi:10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S.M., Singh, T., Tamplin, M. and Chandry, P.S. (2018) "Genomic and Metabolic Characterization of Spoilage-Associated *Pseudomonas* Species," *International Journal of Food Microbiology*, 268, pp. 61–72. doi:10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.01.005.

Tapia-Rodriguez, M.R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G.A., Martinez-Tellez, M.A., Martins, C.M. and Ayala-Zavala, J.F. (2017) "Carvacrol as Potential Quorum Sensing Inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and Biofilm Production on Stainless Steel Surfaces," *Food Control*, 75, pp. 255–261. doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.014.

Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M.A., Prabhakar, A., Shalla, A.H. and Rather, M.A. (2019) "A Comprehensive Review of the Antibacterial, Antifungal and Antiviral Potential of Essential Oils and their Chemical Constituents against Drug-Resistant Microbial Pathogens," *Microbial Pathogenesis*, 134, p. 103580. doi:10.1016/J.MICPATH.2019.103580.

Trejo, M., Douarche, C., Bailleux, V., Pouillard, C., Mariot, S., Regeard, C. and Raspaud, E. (2013) "Elasticity and Wrinkled Morphology of *Bacillus subtilis* Pellicles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), pp. 2011–2016. doi:10.1073/PNAS.1217178110.

United Nations Environment Programme (2021) *Food Waste Index Report 2021*. Nairobi: UNEP. Available at: <https://www.unep.org/es/resources/informe/indice-de-desperdicio-de-alimentos-2021> (Accessed: September 8, 2021).

Wang, G., Qing, L., Tang, W., Ma, F., Wang, H., Xu, X. and Qiu, W. (2021) "AprD is Important for Extracellular Proteolytic Activity, Physicochemical Properties and Spoilage Potential in Meat-Borne *Pseudomonas fragi*," *Food Control*, 124, p. 107868. doi:10.1016/J.FOODCONT.2021.107868.

Wang, G.Y., Wang, H.H., Han, Y.W., Xing, T., Ye, K.P., Xu, X.L. and Zhou, G.H. (2017) "Evaluation of the Spoilage Potential of Bacteria Isolated from Chilled Chicken *in vitro* and *in situ*," *Food Microbiology*, 63, pp. 139–146. doi:10.1016/J.FM.2016.11.015.

Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X. and Zhou, G. (2018) "Biofilm Formation by Meat-Borne *Pseudomonas fluorescens* on Stainless Steel and its Resistance to Disinfectants," *Food Control*, 91, pp. 397–403. doi:10.1016/J.FOODCONT.2018.04.035.

Wang, Y., Feng, L., Lu, H., Zhu, J., Kumar, V. and Liu, X. (2021) "Transcriptomic Analysis of the Food Spoilers *Pseudomonas fluorescens* Reveals the Antibiofilm of Carvacrol by Interference with Intracellular Signaling Processes," *Food Control*, 127, p. 108115. doi:10.1016/J.FOODCONT.2021.108115.

Wang, Y., Hong, X., Liu, J., Zhu, J. and Chen, J. (2020) "Interactions between Fish Isolates *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus aureus* in Dual-Species Biofilms and Sensitivity to Carvacrol," *Food Microbiology*, 91, p. 103506. doi:10.1016/J.FM.2020.103506.

Wang, Y., Yuan, Z. and Tang, Y. (2021) "Enhancing Food Security and Environmental Sustainability: A Critical Review of Food Loss and Waste Management," *Resources, Environment and Sustainability*, 4, p. 100023. doi:10.1016/J.RESENV.2021.100023.

Wijesundara, N.M., Lee, S.F., Cheng, Z., Davidson, R. and Rupasinghe, H.P.V. (2021) "Carvacrol Exhibits Rapid Bactericidal Activity against *Streptococcus pyogenes* through Cell Membrane Damage," *Scientific Reports*, 11, p. 1487. doi:10.1038/s41598-020-79713-0.

Wisplinghoff, H. (2017) "*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli," in Cohen, J., Powderly, W.G., and Opal, S.M. (eds.) *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Elsevier, pp. 1579-1599.e2. doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00181-7.

Zagorec, M. and Champomier-Vergès, M.C. (2017) "Meat Microbiology and Spoilage," in Toldrá, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science (Eight Edition)*. Duxford: Woodhead Publishing, pp. 187–203. doi:10.1016/B978-0-08-100694-8.00006-6.

Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H. and Yao, W. (2018) "Essential Oil Components Inhibit Biofilm Formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via Anti-Quorum Sensing Activity," *LWT*, 92, pp. 133–139. doi:10.1016/J.LWT.2018.02.027.