



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO COMO HERRAMIENTA DE
ESTUDIO DEL MECANISMO DE INACTIVACIÓN BACTERIANA DE
CITRAL Y CARVACROL**

Autor/es

ELISA PÉREZ SÁEZ

Director/es

DIEGO GARCÍA GONZALO Y RAFAÉL PAGÁN TOMÁS

Facultad de Veterinaria

2014/2015

Índice de contenido

<i>Resumen</i>	3
<i>Abstract</i>	5
1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	14
3. Material y métodos.	15
3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.	15
3.2 Evaluación de resistencia de <i>E. coli</i> frente a citral y carvacrol.	16
3.3 Análisis del transcriptoma.	17
3.4 Análisis estadístico	20
4. Resultados.....	21
4.1 Inactivación de <i>E. coli</i> MG1655 con tratamientos de citral y carvacrol como paso previo al análisis transcriptómico.	21
4.2 Análisis transcriptómico de células de <i>E. coli</i> MG1655 mediante microarrays de DNA.....	22
4.3 Verificación del análisis transcriptómico mediante RT qPCR.	26
4.4 Evaluación de la resistencia al citral de mutantes deletéreos.	28
5. Discusión.	33
6. Conclusiones.....	39
7. Referencias bibliográficas.	41

Resumen

La tendencia creciente de evitar el uso de conservantes alimentarios sintéticos está promoviendo la búsqueda de sustitutos de origen natural, como los constituyentes de aceites esenciales (AEs) carvacrol y citral. El uso efectivo del citral y del carvacrol para la conservación de los alimentos requiere un extenso conocimiento sobre sus mecanismos de inactivación microbiana, así como los mecanismos de resistencia y adaptación bacteriana frente a estos compuestos. El uso conjunto de las herramientas moleculares junto con las técnicas tradicionales de microbiología nos ofrece una excelente oportunidad para estudiar estos mecanismos de forma detallada.

El objetivo de este estudio fue la identificación de los genes implicados en la respuesta de *Escherichia coli* al citral y carvacrol mediante el análisis del transcriptoma, para así determinar los genes que se sobre-expresan tras el tratamiento y conocer el mecanismo de respuesta celular a estos compuestos. Además, se estudió la implicación de los genes sobre-expresados en la resistencia al tratamiento con el antimicrobiano mediante el uso de cepas mutantes deletéreas en los genes de interés.

En cuanto a las herramientas moleculares, los microarrays de DNA fueron utilizados para el estudio del mecanismo de inactivación bacteriana por los constituyentes de AEs, y los datos obtenidos fueron confirmados mediante PCR cuantitativa retrotranscriptasa (RT qPCR).

Los resultados obtenidos por microarrays de DNA mostraron que las células tratadas con carvacrol activaron la expresión de un mayor número de genes (61 genes sobre-expresados) que las células tratadas con citral (27 genes sobre-expresados). Mediante RT qPCR se verificó la en las células tratadas con citral de 10 genes (*purH*, *pyrB*, *pyrI*, *sdhA*, *yaaX*, *ybiJ*, *ybjM*, *yejF*, *yejG* e *yneI*), que indicarían que la célula responde al estrés generado mediante la generación de energía y el metabolismo celular, activando los mecanismos de detoxificación e induciendo su eliminación hacia el exterior celular. En el caso de las células tratadas con carvacrol, la técnica de RT qPCR mostró que la de 9 genes (*acrA*, *argG*, *artJ*, *cvpA*, *inaA*, *pspB*, *pspC*, *pspG* y *znuC*) sugeriría que la célula responde al estrés mediante la síntesis de canales iónicos o bombas de expulsión. Además, el carvacrol parece descompensar el equilibrio extracitoplasmático, frente al que la célula respondería con proteínas relacionadas con

su protección ante la infección de fagos (proteínas Psp) o colicina V para inhibir el crecimiento de otras bacterias.

La evaluación de la resistencia de mutantes deletéreos en los genes sobre-expresados sugirió que ninguno de estos genes estudiados están implicados por sí solos en la resistencia al citral, si no que sería necesaria una acción conjunta de varios de estos genes para realizar una respuesta adecuada frente a este compuesto antimicrobiano.

Para la consecución de este estudio fue necesaria la puesta a punto de la metodología necesaria para la evaluación de la expresión génica de *Escherichia coli* mediante RT qPCR. Además, el desarrollo de esta investigación ha requerido del uso conjunto de varias técnicas de microbiología, tanto moleculares como tradicionales. De este modo, a través de los microarrays de DNA se pudo obtener una visión global de la respuesta celular, señalando diferentes genes candidatos que fueron validados por RT qPCR. A partir de estos resultados, se evaluó la resistencia celular al citral mediante técnicas de microbiología tradicional, como es la siembra en diferentes medios de recuperación. Esta investigación demuestra la importancia e interés del uso conjunto de diferentes técnicas microbiológicas para evaluar el mecanismo de inactivación microbiana por compuestos de aceites esenciales, y ayudar a diseñar procesos de conservación de los alimentos más eficientes y efectivos.

Abstract

The growing trend of avoiding the use of synthetic food preservatives is promoting the irreplaceable use of natural preservatives, such as constituents of essential oils (EOs) carvacrol and citral. Effective use of citral and carvacrol for food preservation requires an extensive knowledge of the mechanisms of microbial inactivation and bacterial resistance and adaptation to these compounds. The use of molecular tools along with traditional microbiological techniques provides an excellent opportunity to deeply study these mechanisms.

The objective of this study is to identify the genes involved in the response of *Escherichia coli* to citral and carvacrol through transcriptomic analysis, in order to determine the up-regulated genes after the treatments and infer the mechanism of cellular responses to these compounds. Moreover, involvement of those up-regulated genes in resistance to the antimicrobial treatments was evaluated by using deleterious mutant strains in genes of interest.

In regard to molecular tools, DNA microarrays were used to study the mechanism of bacterial inactivation by EO constituents and the data was verified by RT qPCR (Retrotranscriptase quantitative PCR).

The results obtained by DNA microarrays showed that cells treated with carvacrol activated the expression of a larger number of genes (61 up-regulated genes) than cells treated by citral (27 up-regulated genes). Through RT qPCR, over-expression of 10 genes of citral-treated cells was verified (*purH*, *pyrB*, *pyrI*, *sdhA*, *yaaX*, *ybiJ*, *ybjM*, *yejF*, *yejG* and *yneI*), which would indicate that cells respond to the generated stress by increasing energy generation and cellular metabolism, activating the mechanisms of detoxification and inducing their removal out of the cell. For carvacrol-treated cells, the results of over-expression of 9 genes (*acrA*, *argG*, *artJ*, *cvpA*, *inaA*, *pspB*, *pspC*, *pspG* and *znuC*) suggest that the cell responds through synthesis of ion channels or efflux pumps. Furthermore, carvacrol seems to affect the extracytoplasmic balance, and the cell would be responding with proteins related to protection against phage infection (Psp proteins) or colicine V to inhibit the growth of other bacteria.

Evaluation resistance of deleterious mutants in up-regulated gene suggests that none of these genes studied are individually involved in citral resistance, but

simultaneous and/or combined action of several of these genes would be necessary for an adequate response to this antimicrobial compound.

To perform this study, it was necessary to set up the methodology for assessing gene expression of *E. coli* by RT qPCR. Furthermore, the development of this research has required the combination of several microbiological techniques, both molecular and traditional. Thus, through DNA microarrays, an overview of the cellular response was obtained, indicating different candidate genes which were validated by RT qPCR. From these results, cell resistance to citral was evaluated by traditional microbiological techniques, such as plating in different recovery media. This research demonstrates the importance and relevance of combining different techniques and the significance of using different microbiological techniques to evaluate the mechanism of microbial inactivation by antimicrobial compounds, and to help in the design of more efficient preservation processes.

1. Introducción

Desde hace miles de años, el hombre ha usado diferentes elementos a su alcance como conservantes de los alimentos. Este es el caso del uso de la sal común (NaCl) en alta concentración para conservar alimentos cárnicos y pesqueros o el nitrato potásico utilizado ya por los romanos para curar alimentos cárnicos; procesos que todavía se siguen utilizando para alargar la vida útil de los alimentos. A partir del siglo XVIII, se empezaron a estudiar con detalle mayor variedad de antimicrobianos sintéticos que todavía se utilizan para la conservación en la industria alimentaria.

Los antimicrobianos tradicionales o sintéticos se han utilizado ampliamente para garantizar la seguridad y estabilidad de los alimentos, inhibiendo el crecimiento de patógenos alterantes o el fenómeno de la esporulación. Los conservantes químicos más utilizados son los ácidos orgánicos, los nitritos y nitratos, los sulfitos y los antioxidantes fenólicos con cierto poder antimicrobiano (Vurma *et al.*, 2006). Los ácidos orgánicos, como los sorbatos, propionatos y benzoatos, son los más ampliamente utilizados (Kabara y Eklund, 1991). El problema del uso de los ácidos orgánicos como conservantes alimentarios es que su actividad específica se encuentra muy limitada por el pH del alimento, y en ocasiones contribuyen a la acidificación de este, interfiriendo en sus características organolépticas. Su eficiencia es muy dependiente de los factores de procesado, existen resistencias específicas de microorganismos patógenos a muchos compuestos y en muchas ocasiones, la concentración a añadir está limitada por la legislación. Además, a ello se une que existe una creciente tendencia a evitar el uso de conservantes alimentarios sintéticos (Burt, 2004). Por esta razón, la comunidad científica y la industria alimentaria se están viendo obligadas a explorar el uso de compuestos naturales como antimicrobianos alternativos. Los aceites esenciales (AEs) han sido utilizados como antisépticos, con fines medicinales y agentes conservantes de los alimentos durante cientos de años (Jones, 1996). Además, se ha demostrado que estas sustancias y sus compuestos constituyentes exhiben propiedades antibacterianas (Ouattara *et al.*, 1997), antimicóticas (Kurita *et al.*, 1981; Suhr y Nielsen, 2003), antivirales (Aruoma *et al.*, 1996) y antiparasitarias (Monzote *et al.*, 2007). En este aspecto, los AEs derivados de plantas están atrayendo considerables esfuerzos de investigación por su potencial uso como conservantes y aditivos alimentarios (Bakkali *et al.* 2008).

Los AEs se pueden encontrar en los diferentes órganos cormofíticos de espermafitas como en los foliolos, raíces, tallos, inflorescencias, semillas y frutos. Además, su composición, mezcla de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como los terpenoides, puede variar en función de la especie vegetal, del momento de la recolección y de la localización geográfica, órgano de la planta y del método de extracción usado (Calo *et al.*, 2015). Al ser tan variable la composición resulta conveniente estudiar sus principales componentes individualmente, y seleccionar aquellos que presenten mayor actividad antimicrobiana, como el citral o el carvacrol.

El citral (GRAS, 21 CFR 182.60) y el carvacrol (GRAS, 21 CFR 172) son reconocidos como aditivos alimentarios seguros (GRAS), y están aprobados por la “Food and Drugs Administration” (FDA). El **citral**, cuya actividad antimicrobiana ha sido previamente demostrada por numerosos autores (Onawunmi, 1989; Friedman *et al.*, 2002; Somolinos *et al.*, 2010; Espina *et al.*, 2010), es un aldehído monoterpenoide acíclico insaturado que se encuentra en las hojas y frutos de diferentes especies de plantas como el mirto (*Myrtus claraensis*), la albahaca (*Ocimum basilicum*), el limonero (*Citrus × limon*), la citronela (*Cymbopogon citratus*), la lima (*Citrus × aurantifolia*), el naranjo (*Citrus × sinensis*) y la bergamota (*Citrus × bergamia*). El citral está compuesto por una mezcla de dos isómeros, el geraniol y el neral. El **carvacrol**, isómero del timol, es un fenol monoterpenoide que se encuentra en las hojas de diferentes especies de plantas como el orégano (*Origanum vulgare*), el tomillo (*Thymus vulgaris*) o el romero (*Rosmarinus officinalis*). Su capacidad inhibitoria y biocida ha sido demostrada en diferentes bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni* y *Lactobacillus sakei* (Ultee *et al.*, 1999; Cosentino *et al.*, 1999; Friedman *et al.*, 2002; Gill y Holley, 2006).

Aunque la capacidad inhibitoria del crecimiento y bactericida del citral y el carvacrol ha sido demostrada en estudios previos, poco se conoce sobre su mecanismo de acción. El efecto del carvacrol se relaciona con la inhibición de la ATPasa de membrana encargada de regular el pH celular, la despolarización de la membrana, disipación del gradiente de potasio, inhibición de la respuesta celular, alteración de las estructuras celulares y coagulación del material citoplasmático (Hyldgaard *et al.*, 2012). En cuanto al citral, su capacidad antimicrobiana se relaciona con la permeabilización de envolturas celulares, sobretodo daño en la membrana externa (Somolinos *et al.*, 2008), y daño en el material genético celular (Chueca *et al.*, 2014).

En el pasado, se han desarrollado procesos combinados satisfactorios con citral o carvacrol en combinación con otras tecnologías de conservación, como altas presiones hidrostáticas (Somolinos *et al.*, 2008; Burt *et al.*, 2004), tratamientos térmicos moderados (Somolinos *et al.*, 2010; Espina *et al.*, 2014) o pulsos eléctricos de alto voltaje (Chueca *et al.*, 2015). La reducción de la intensidad de los tratamientos conseguida evita alteraciones en las características sensoriales de los alimentos. Para ello, resulta de interés conocer los daños que estos compuestos antimicrobianos causan en los microorganismos y sus moléculas o estructuras diana, de modo que se puedan desarrollar tratamientos óptimos o procesos combinados basados en la actuación sinérgica de las barreras que se combinan. En este sentido, las investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación han demostrado que el mecanismo de acción del citral y el carvacrol determinó que el acceso a sus dianas se vio impedido por la barrera que supone la membrana externa de los microorganismos Gram-negativos (Somolinos *et al.*, 2010; Espina *et al.*, 2014). El uso simultáneo de estos compuestos junto con tratamientos térmicos que dañaban subletalmente la membrana externa, permitió potenciar el efecto antimicrobiano de citral y carvacrol (Somolinos *et al.*, 2010; Espina *et al.*, 2014).

Sin embargo, el uso efectivo del citral y del carvacrol todavía requiere de un conocimiento más detallado sobre sus mecanismos de inactivación microbiana, y en especial, sobre los mecanismos de resistencia y adaptación microbiana frente a estos compuestos que recientemente se han puesto de manifiesto. Con este objetivo, las herramientas moleculares constituyen una excelente oportunidad para el estudio de estos mecanismos de forma precisa.

La era de las “ómicas” ha cambiado la forma de estudiar la fisiología microbiana introduciendo herramientas de análisis integral, como genómica comparativa y técnicas de expresión global, incluyendo los microarrays de DNA (transcriptómica) (Wecke y Mascher, 2011). El estudio de la expresión génica por el análisis del transcriptoma (RNA transcrito presente en la célula bajo ciertas condiciones), podría ayudarnos a descubrir los mecanismos de resistencia celular y la vía de regulación que coordina la respuesta al estrés en los microorganismos (Jordan *et al.* 2008), en nuestro caso el estrés producido por los compuestos de AEs. Las herramientas moleculares nos ofrecen la posibilidad de realizar un estudio exhaustivo del transcriptoma, es decir, del RNA que se produce en la célula durante el tratamiento con citral o carvacrol y determinar la de

ciertos genes que pueden estar relacionados con la resistencia microbiana frente a estos compuestos. De hecho, ya se han realizado estudios de regulación del genoma bacteriano ante diferentes estreses mediante análisis del transcriptoma con resultados exitosos. Park *et al.* (2014) estudiaron los cambios en el transcriptoma de *Escherichia coli* para elucidar el mecanismo de resistencia de las procariotas frente a micotoxinas. También, se ha utilizado por su gran potencial para estudiar los cambios de regulación del genoma bacteriano frente a diferentes tecnologías de conservación, como tratamientos térmicos, pulsos eléctricos de alto voltaje (Chueca *et al.*, 2015), desecación (Deng *et al.*, 2012), y tratamientos de desinfección (Ceragioli *et al.*, 2010).

En los estudios de transcriptómica se ha utilizado con relativa frecuencia la bacteria *E. coli* ya que ha sido uno de los organismos más caracterizados en biología molecular, y concretamente la cepa MG1655, que fue la primera cuyo genoma bacteriano fue secuenciado completamente (Blattner *et al.*, 1997), y por ello, en la que se han realizado los estudios más relevantes acerca de fisiología bacteriana.

Un **microarray de expresión** (Figura 1) es un formato experimental basado en la fijación de sondas, que representa los genes, sobre un sustrato sólido y que son expuestos a las moléculas diana o cDNA de la muestra, que son un reflejo del RNA existente en la población microbiana inicial. El nivel de hibridación entre la sonda específica (probe) y la molécula diana (target) se indica mediante fluorescencia y se mide por análisis de imagen, indicando el nivel de expresión del gen correspondiente a la sonda en la muestra problema.

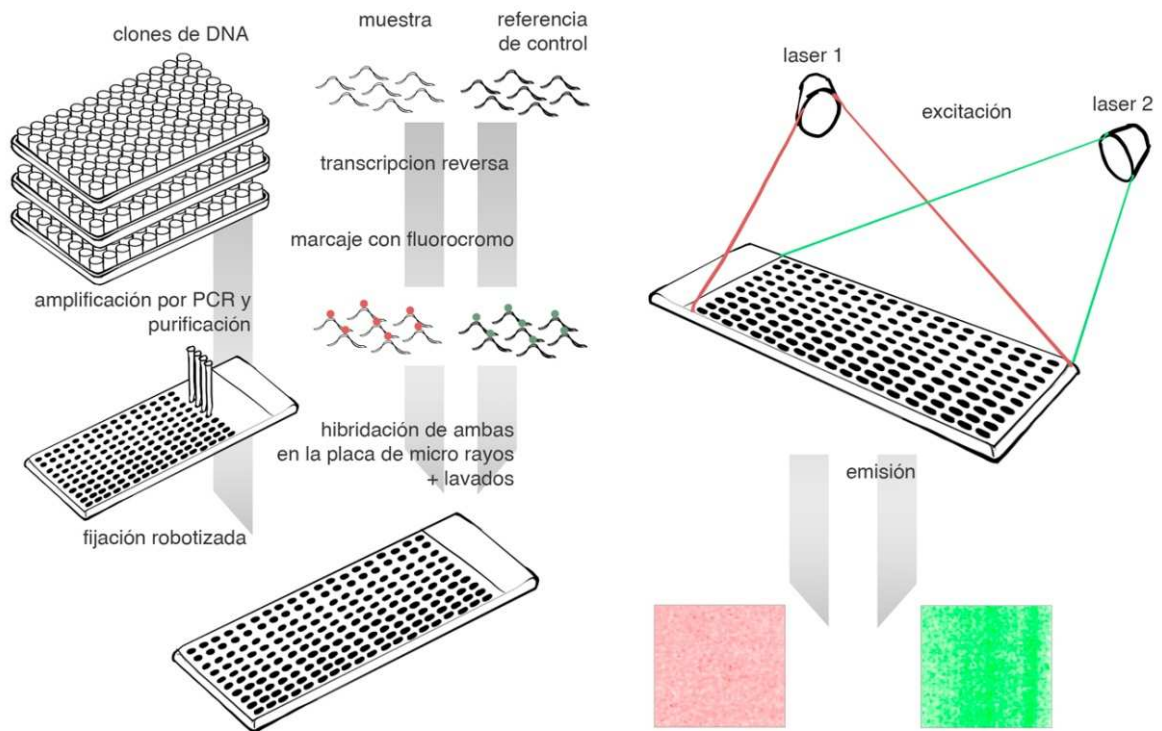


Figura 1. Esquema del fundamento del microarrays de DNA. Cada clon de DNA o gen de *E. coli* MG1655 se multiplica por PCR y se fija a un pocillo de la placa de microensayo. A continuación, se hibrida el cDNA de la muestra y otro patrón con el que comparar la fluorescencia. El cDNA de la muestra se sintetiza a partir del RNA aislado y se marca con un fluorocromo. Solo el cDNA complementario del clon fijado de cada pocillo quedará unido tras los sucesivos lavados y emitirá fluorescencia que será captada por el equipo.

El estudio del transcriptoma mediante microarrays de DNA se ha utilizado exitosamente para describir el modo de acción de diferentes antibióticos (Wecke y Mascher, 2011) y los mecanismos de adaptación microbiana e inactivación por calor (Guernec *et al.*, 2013) y altas presiones hidrostáticas (Bowman *et al.*, 2008). Esta técnica también se ha utilizado anteriormente en experimentos previos del grupo para estudiar los cambios en el transcriptoma de *E. coli* MG1655 tratadas con pulsos eléctricos de alto voltaje (Chueca *et al.*, 2015). Por ello, se escogió el microarrays de DNA como la primera herramienta molecular para estudiar la expresión génica en nuestro estudio.

El microarrays de DNA es una herramienta que permite realizar un cribado inicial de expresión génica, pero que debe ser verificado posteriormente por una técnica

más robusta. Uno de los procedimientos para verificar los resultados es el método de **RT qPCR**, compuesto por dos técnicas: una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) realizada con una enzima DNA polimerasa retrotranscriptasa (RT-PCR) capaz de sintetizar cDNA (DNA complementario) a partir de RNA seguida de la técnica PCR cuantitativa (qPCR) que monitoriza a tiempo real los niveles de expresión génica.

La transcripción reversa (RT) seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una poderosa herramienta para la detección y cuantificación de RNA (Pfaffl *et al.*, 2002). Su uso se ha visto incrementado debido a su alta sensibilidad, buena reproducibilidad y amplio rango de cuantificación. Además, se considera el método más sensible para la detección y cuantificación de niveles de expresión génica, donde el RNA está en baja concentración y permite elucidar pequeños cambios en los niveles de expresión de RNA (Wittwer *et al.*, 1997; Bustin, 2000; Pfaffl y Hageleit, 2001).

Para permitir una cuantificación precisa de la expresión génica, es necesaria una estrategia adecuada de normalización en la que se usen controles internos en los que se eliminen las variaciones y se minimice la introducción de errores experimentales durante las etapas de extracción de RNA y síntesis de cDNA (Bustin, 2000; Eleaume y Jabbouri, 2004; Sue *et al.*, 2004; Vandecasteele *et al.*, 2002). Además, estos genes utilizados como controles internos deben tener una expresión constante bajo cualquier condición (Botteldoorn *et al.*, 2006). Por eso, se recomienda usar al menos tres genes estables de control interno o house-keeping genes (HKG) para el cálculo del factor de normalización para la cuantificación de RNA procariota (Bustin, 2000; Nielsen y Boye, 2005; Savli *et al.*, 2003).

Existen otras técnicas para realizar análisis de la expresión génica como la construcción de genes reporteros, pero en comparación con esta, la RT q-PCR tiene la ventaja de que no requiere manipulación genética de la cepa (Ayala *et al.*, 2004), lo que se traduce en un ahorro de tiempo y costes. Tradicionalmente los niveles de expresión génica se estudiaban mediante la técnica Western blotting, cuyo método no permitía estudiar diferentes proteínas simultáneamente y resultaba muy débil para comparaciones relativas de expresión génica (Savli *et al.*, 2003).

Una vez identificados los genes que se sobre-expresan durante el tratamiento, es posible evaluar el papel de esos genes en la resistencia microbiana frente a dicho tratamiento. Para ello, se **evalúa la resistencia de cepas mutantes** a las que se haya

eliminado esos genes sobre-expresados. La comparación de la resistencia entre la cepa parental y sus correspondientes mutantes, permitiría identificar la implicación de estos genes en los mecanismos de inactivación, resistencia y reparación microbiana, lo que a su vez permitiría profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de los compuestos antimicrobianos.

2. Objetivos

Objetivo 1. Identificación de los genes implicados en la respuesta de *Escherichia coli* al citral y carvacrol mediante el análisis del transcriptoma a través del uso de microarrays de DNA y verificación mediante PCR cuantitativa. De esta manera, se podrían identificar los genes que se hayan sobre-expresado tras el tratamiento.

Objetivo 2. Evaluación de la resistencia microbiana frente al citral de cepas mutantes deletéreas en los genes sobre-expresados durante los tratamientos con estos antimicrobianos. De este modo, se podría determinar la implicación de estos genes sobre-expresados en su resistencia a un tratamiento con citral.

Cabe señalar, que el estudio de la influencia de la delección de los genes sobre-expresados en la resistencia al carvacrol ya se había realizado con anterioridad por el grupo de investigación.

Los conocimientos aportados por esta investigación permitirán identificar los genes que se sobre-expresan durante los tratamientos con citral y carvacrol y determinar su papel en la resistencia microbiana a estos antimicrobianos, lo que contribuirá a un mejor conocimiento del mecanismo de inactivación mediante citral y carvacrol, y de este modo, a desarrollar procesos combinados con sólidas bases científicas, para la obtención más eficiente y eficaz de alimentos nutritivos, seguros y estables.

La consecución de estos dos objetivos ha requerido la puesta a punto en nuestro grupo de investigación de la metodología necesaria para la evaluación de la expresión génica de *Escherichia coli* mediante RT qPCR.

3. Material y métodos.

3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo.

Para el análisis del transcriptoma se utilizó la cepa *Escherichia coli* MG1655 (Blattner *et al.*, 1997), ampliamente utilizada en estudios de fisiología microbiana. Para el estudio de la implicación de los genes sobre-expresados en la resistencia microbiana al citral se utilizaron las mutantes deletéreas simples de diferentes genes de la colección Keio, realizadas a partir de la cepa de *E. coli* BW25113, suministradas por el National Institute of Genetics de Japón (Baba *et al.*, 2006).

Las cepas se mantuvieron en crioviales (Scharlau, Barcelona, España) a -80°C . A partir de estos crioviales se sembraron semanalmente placas de medio Agar Triptona-Soja (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) con extracto de levadura (Oxoid LTD.) al 0,6% por agotamiento en estría durante todo el periodo de realización de la investigación.

Para la preparación de las suspensiones microbianas se realizaron precultivos sembrando las colonias aisladas en la placa, en 5 mL de cultivo de Caldo Triptona-Soja (Oxoid LTD.) con extracto de levadura al 0,6% (TSBEL) y se incubaron durante 18 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Con estos precultivos se inocularon frascos de vidrio de 50 mL de caldo de cultivo TSBEL para conseguir una concentración inicial de aproximadamente 10^9 UFC/ml en fase estacionaria. Inmediatamente tras la siembra, los frascos se incubaron en agitación continua a 130 rpm (Selecta, modelo Rotabit, Barcelona, España), a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en una estufa de aire forzado (Selecta, modelo Hotcold UL).

Para determinar la influencia de los genes delecionados en la resistencia al citral, se utilizó la cepa BW25113 empleada previamente por el grupo de Baba *et al.* (2006) para realizar la colección Keio de mutantes simples deletéreos. Cabe señalar que el estudio del transcriptoma lo realizamos en la cepa MG1655 debido a que esta es la cepa de referencia para este tipo de estudios, y a que ambas cepas son cercanas en parentesco, de modo que los resultados que se obtienen son directamente comparables.

3.2 Evaluación de resistencia de *E. coli* frente a citral y carvacrol.

El citral y el carvacrol, como constituyentes de aceites esenciales de vegetales, son prácticamente inmiscibles en agua. Para suspender el citral ($\geq 96\%$; Sigma-Aldrich, Madrid, España) o carvacrol (98%; Sigma-Aldrich) en tampón citrato-fosfato pH 4,0 (Panreac, Barcelona, España; McIlvaine) se siguió el método de agitación vigorosa para preparar suspensiones descrito por Friedman *et al.* (2002). No se utilizaron solventes o detergentes en estos experimentos porque pueden influir en el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales (Burt, 2004) y dañar las membranas celulares.

Para realizar el tratamiento se centrifugó 1 mL de cultivo estacionario durante 5 minutos a 10.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin, Hamburgo, Alemania) y el precipitado se resuspendió en 1 mL de tampón citrato-fosfato pH 4,0. A continuación, 100 μ L de la suspensión celular se inocularon en un tubo de 10 mL de tampón citrato-fosfato (McIlvaine) pH 4,0 con citral o carvacrol, obteniendo una concentración microbiana inicial de 10^7 UFC/mL.

El efecto del tratamiento se determinó mediante la siembra y el recuento en placa de las células tratadas. Estas se sembraron en TSAEL y se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ para detectar las células viables. Para evaluar la presencia de daño subletal tras el tratamiento, las muestras se sembraron simultáneamente TSAEL con NaCl (Panreac; TSAEL-CS) y en TSAEL con sales biliares (Oxoid LTD.; TSAEL-SB.) a $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$, para evaluar la integridad de la membrana citoplasmática y de la membrana externa en las células supervivientes, respectivamente. La concentración de sales biliares y de cloruro sódico se determinó previamente como la concentración máxima no inhibitoria para las células nativas de *E. coli* BW25113 (4% de NaCl y 0,2% de SB) y de *E. coli* MG1655 (6% de NaCl y 0,3% de SB); no se muestran los datos.

Tras la incubación, las colonias fueron contadas con un contador automático de análisis de imagen (Protos; Analytical Measuring Systems, Cambridge, Inglaterra) descrito previamente por Condón *et al.* (1996).

La inactivación de las células viables como resultado del recuento de supervivientes en el medio no selectivo (TSAEL) se expresó en términos de reducción logarítmica de unidades formadoras de colonias (UFC) tras el tratamiento con citral o carvacrol. El daño subletal se expresó como la diferencia entre los recuentos obtenidos

en medio no selectivo (TSAEL) y en medio selectivo (TSAEL-CS y TSAEL-SB). Todos los recuentos microbiológicos se realizaron por triplicado.

Puesto que el medio de tratamiento de elección fue tampón citrato-fosfato a pH 4,0, se comprobó en experimentos previos que la resistencia microbiana de las diferentes mutantes deletéreas simples utilizadas no se veía afectada por el pH ácido del medio.

3.3 Análisis del transcriptoma.

3.3.1 Análisis transcriptómico mediante microarrays.

3.3.1.1 Extracción RNA, marcado e hibridación.

Para proceder con la extracción de RNA, tras los 10 minutos de tratamiento explicados anteriormente, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm y 4°C durante 20 minutos (centrífuga Heraeus, modelo Megafuge 1.0 R, Hanau, Alemania). El RNA de las muestras tratadas se aisló mediante el kit RNeasy (Qiagen LTD., West Sussex, Inglaterra) y se envió a la empresa externa Bioarray S.L. (www.bioarray.es).

La calidad del RNA aislado se evaluó mediante el kit R6KScreenTape (Agilent, Santa Clara, Estado Unidos) y todas las muestras mostraron valores de RIN (Número de integridad de RNA) mayor a 9 (valor 1 para una muestra de RNA totalmente degradada y valor 10 para un muestra intacta). El marcaje y la hibridación se evaluaron con Agilent Two-Color Microarray-Based Prokaryote Analysis Fair Play III Labeling Protocol v. 1.3. Para ello, el cDNA marcado se hibrida en las placas de Agilent's *E. coli* Microarray Kit 8x15K, ID 020097 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las lecturas de las placas de microarrays se realizaron mediante el escáner Agilent microarray (G2505C), y los datos fueron procesados con el software Agilent Feature Extraction (v.1007).

3.3.1.2 Análisis de la expresión génica de microarrays de DNA.

Los datos fueron normalizados usando el método *Tquantile* que permite realizar comparaciones entre los microarrays. Las correcciones de los datos se realizaron mediante la corrección de Benjamini y Hochberg (1995). Los puntos ajustados con el valor $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos, y la probabilidad de falsos positivos se consideró menor del 5%. Los niveles de expresión se obtuvieron de 3

réplicas biológicas independientes en las muestras tratadas y de 4 réplicas biológicas independientes de las muestras no tratadas que fueron comparadas usando el método Limma (Smyth, 2004) del software Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004).

3.3.1.3 Análisis transcriptómico mediante PCR reversa y cuantitativa.

3.3.1.3.1 Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

El RNA de las muestras se aisló mediante RNeasy® Minikit (Qiagen). Una vez extraído, la concentración de RNA en la muestra y la calidad del mismo se midió mediante Nanodrop 2000 UV-Vis (ThermoScientific, Massachusetts, Estados Unidos).

A partir de 1 µg de RNA se sintetizó DNA complementario (cDNA) mediante la técnica RT-PCR usando la enzima transcriptasa reversa M-MLV o SuperScript (InVivoGen, Breda, Países Bajos) y una mezcla de cebadores aleatorios (primers random; InVivoGen) (Figura 2). El termociclador (MultiGenII, Labnet, Edison, Estados Unidos) se configuró según indica el fabricante.

Las muestras de RNA aislado se conservaron en criocongelación a -80°C y las muestras de cDNA a -20°C.

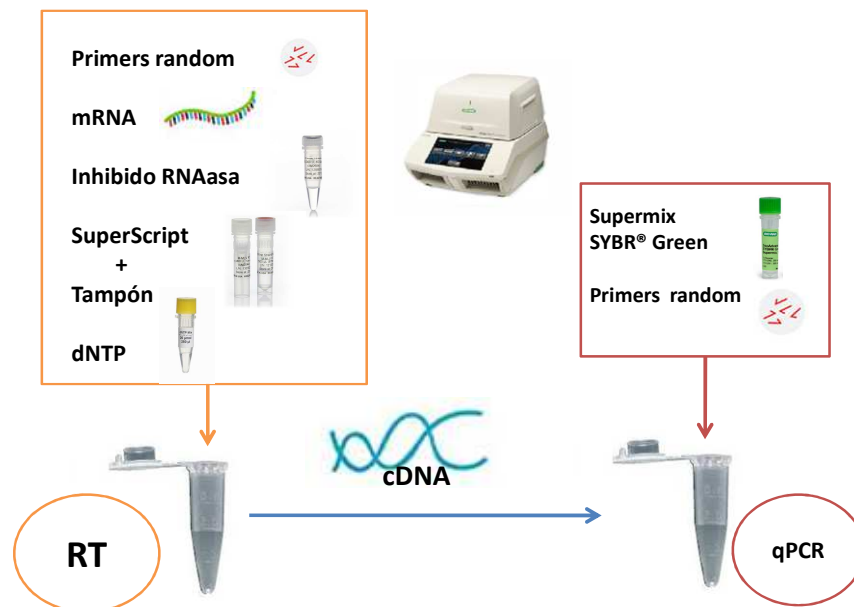


Figura2. Esquema de la PCR cuantitativa retrotranscriptasa. Primero se realiza la PCR retrotranscriptasa (RT), donde a partir del RNA aislado de la muestra se sintetiza el DNA complementario. Este DNA complementario se cuantificará mediante una PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR).

3.3.1.3.2 Diseño de cebadores para PCR cuantitativa.

Las secuencias a amplificar en la PCR cuantitativa eran aquellas regiones del genoma que corresponden a los genes sobre-expresados en el análisis transcriptómico de microarrays. El nivel de expresión de estos genes se relacionó con la expresión de genes de referencia o HKG (House-keeping genes): dos genes codificantes de factores sigma (*rpoD* y *rpoS*), el gen codificante de la pirrolina-5-carboxilato-reductasa (*proC*) y el gen codificante de la GTP pirofosfoquinasa (*relA*) (Savli *et al.*, 2003). El diseño de los cebadores o primers (Tabla 1) se realizó mediante la aplicación Primer-BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los cebadores (Tabla 1) fueron suministrados por Invitrogen.

Tabla 1. Cebadores diseñados para cada extremo de los genes sobre-expresados y su localización en el genoma. El “cebador forward” es el cebador que hibrida en la cadena nucleótidos antes que la secuencia de interés y el “cebador reverse” es el que hibrida en la cadena nucleótidos después del fin de la secuencia de interés para proceder a la amplificación. El “CDS” se refiere a la secuencia de DNA codificante marcando su inicio y su final en el genoma secuenciado.

Nombre gen	Primer Forward	Primer Reverse	Inicio CDS	Fin CDS
<i>acrA</i>	AGGAAGTCGTTGCTGGACTG	TTGGTACAGAACGGTCAGGC	484426	485619
<i>argC</i>	TCAACCAGAGATCGCCACAC	TGGGTACACCCGATTTCAG	4155001	4156005
<i>argG</i>	TATCTGGGGTGACCGTAGCA	GCA GTTCAGCATTGGTCAGC	3318637	3319980
<i>artJ</i>	AGTTTTCACCTCCGGGTGCT	GCCGATCTGAAAGGCAAACG	899844	900575
<i>cvpA</i>	GCCCGTAAACCAGACTGACA	GGCTTTGTTCTGTAAGCGTT	2430275	2430763
<i>inaA</i>	TCAACATGGCTTGCCGTACT	ATATGGCGGGGTTTCATCAGC	2348822	2349472
<i>mdtM</i>	AAGCATACAGACTGGTGCCC	TACCCATTCAACTGGTCGGC	4567287	4568519
<i>mtr</i>	CAGCAGGCTACCAAAGGTGA	TTGTGGTGTGGTTGAGCACT	3304573	3305817
<i>ndh</i>	AAATACTCCGCCAACCTGGG	TGTGCAATTCAGCGGAGAGT	1166085	1167389
<i>proC</i>	AATGATGTCGGCGATTTCG	CTTCCAGGCAAATCTGGGT	404835	405644
<i>pspA</i>	CTCGCCGATTGAACAAGCG	ACGTGCCAGATCCTCTCTCT	1368079	1368747
<i>pspB</i>	TAGCGCAA CTGGCTGATGAA	CGATCCCTCCAGTTCGGATG	1368801	1369025
<i>pspC</i>	AACTGGTGCGTATCCTGGTG	TGTTGTCCGGCATTGGATCA	1369025	1369384
<i>pspD</i>	GCAGGCAAGCTGGTACTTCT	AGCCAGCAACATTTTCAGCG	1369393	1369614
<i>pspF</i>	CGTCGGCACGTTCAAATCTC	TGCGCGCGGTTAAATGAAAA	1366935	1367912
<i>pspG</i>	CCATTATGTTCTCGGCGGT	AATAACCCACACCACCGCAA	4262840	4263082
<i>purC</i>	CGAGTCGGAAGTGGTGTGA	CGTATGGCATTACGCTTGCC	2428721	2430238
<i>purH</i>	GCGAACTTTTCACGCACTC	AAGAAGCCTCCGTTGCTACC	4205943	4207532
<i>purM</i>	GTTGTGATCCGCAAACCACC	ACTCCAGCACTGACTTCACG	2621197	2622234
<i>pyrB</i>	ATCGCATCGACGTAAGTGCT	CTTCTCCGACAGCGCAATA	4471460	4472395
<i>pyrI</i>	ATCAGATCTTTGCGGCCCAT	TTCAAGCTGACCGAAACGGA	4470986	4471447
<i>relA</i>	TCCACCATCTCAACACCACG	AGTCGTGTGAGTGCTTAGCC	2911417	2913651
<i>rpoD</i>	CCGATGATCTGATGCTGGCT	GTGCGCCGATTTCAGATTTC	3213047	3214888
<i>rpoS</i>	GCTCGAACAGCATTGACG	CGAAAAAGCGTTGCTGGACA	2866559	2867551
<i>sad/nusB</i>	CGACGGACTGATGAAGCCAT	AGACAGTTCTGACAGCGCAA	435137	435556
<i>sdhA</i>	TTTCCCGTACCTTCGCTCAC	TGACCGGTAACCTTGGTCGG	755907	757673
<i>yaaX</i>	AGCACAGGCTGCGGAAATTA	CCAGTGACCTCCATCCCAGT	5234	5530
<i>ybiJ</i>	GGCTTTCTCAGCGTTTCG	ATCCAGGCACAGAACATGA	837665	837925
<i>ybiM</i>	GCTTAGGTTTATGCGCCAG	GAGCGGAATCTCTCACGG	841796	842056
<i>yejF</i>	TCAGGTTGCCTTCCCATTTC	AGTGTTTACCCGCTCGTAG	2276300	2277889
<i>yejG</i>	GTTGCAGCAA ACTCGTCTG	AGCGGTTAAGCGACATCGAA	2277893	2278237
<i>ygaV</i>	AATTACAGGCCAGTCCGAA	ACCGCTAAGCATGCACAGAA	2797211	2797510
<i>yneI</i>	CCAGTCAACAAATTCGCCG	GCGCTCGTAGCGAAGAAATG	1613315	1614703
<i>znuC</i>	GTGCTGGATGAACCCACTCA	ATCCAGTTCACGACGCACTT	1942662	1943417

3.3.1.4 PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo en el equipo CFX96Touch™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, Hercules, EE.UU), propiedad del grupo del Dr. Pascual López Buesa y la Dra. Carmen Burgos Serrano. El mix de fluorocromo utilizado fue SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: preincubación a 98°C durante 30 segundos, seguido por 50 ciclos (98°C durante 10 segundos y 60°C durante 30 segundos). El análisis se realizó por triplicado y fue analizado con REST-MCSv.2.0 (Pfaffl *et al.*, 2002).

3.4 Análisis estadístico.

El t-test o análisis ANOVA fue usado para detectar diferencias estadísticas entre las muestras, mediante la herramienta GraphPad PRISM® (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). La significancia estadística de cada uno de ellos se consideró a $p=0.05$.

4. Resultados

4.1 Inactivación de *E. coli* MG1655 con tratamientos de citral y carvacrol como paso previo al análisis transcriptómico.

Para tratar las células de *E. coli* MG1655 para la extracción de RNA y el posterior análisis transcriptómico mediante microarrays de DNA o PCR cuantitativa, se seleccionaron unas condiciones de tratamiento en las que se consiguiese una inactivación celular menor del 50%, con objeto de encontrar unas condiciones letales en las que la mayoría de las células estuvieran vivas para poder desarrollar una respuesta transcriptómica. En este sentido, la presencia de un elevado porcentaje de células dañadas subletalmente tras el tratamiento sería también un indicativo de que nos podríamos encontrar ante la respuesta transcriptómica deseada: muchas células afectas por el tratamiento, pero todavía vivas y capaces de responder al mismo.

Como se muestra en la figura 3A, al ensayar las diferentes concentraciones de citral se consideró que el tratamiento de 50 ppm de citral durante 10 minutos era el que cumplía las condiciones establecida para tratar las células y posteriormente, analizar su transcriptoma (inactivación inferior al 50%). En cuanto al carvacrol (Figura 1B), 100 ppm de este compuesto provocaron una inactivación similar y ocasionaron mayores daños subletales en la membrana externa que el resto de las concentraciones ensayadas, por lo que se seleccionaron estas condiciones de tratamiento.

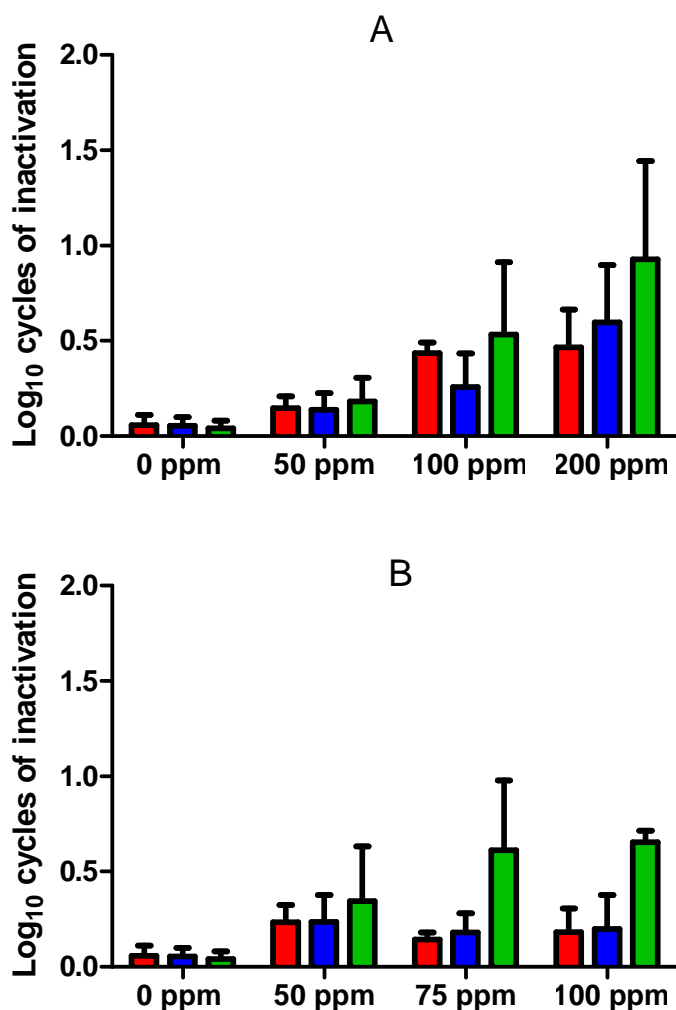


Figura 3. Ciclos logarítmicos de inactivación (\log_{10}) de células de *Escherichia coli* MG1655 en fase estacionaria tras los tratamientos con citral (A) y carvacrol (B) en tampón citrato-fosfato a pH 4,0. Las células supervivientes fueron recuperadas en medio no selectivo (barras rojas) y en medio selectivo con 3% cloruro de sodio (barras azules) o 0,1% sales biliares (barras verdes). Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM).

4.2 Análisis transcriptómico de células de *E. coli* MG1655 mediante microarrays de DNA.

4.2.1 Microarrays de DNA de células tratadas con citral.

El análisis estadístico del microarrays de DNA indicó que tras el tratamiento con citral (50 ppm, 10 min de tratamiento, tampón citrato fosfato pH 4,0), 156 genes

mostraron diferencias transcripcionales ($p < 0,05$) cuando se compararon con la expresión génica de las células control (0 ppm, 10 min, pH 4,0). De estos 156 genes con diferencias transcripcionales ($p < 0,05$), 129 genes se hallaban reprimidos y 27 sobre-expresados. La significación y las diferencias en los niveles de transcripción de todos los genes se representan en la gráfica de volcán (Figura 4). La parte superior de la gráfica muestra los genes con mayor tasa de cambio y considerados estadísticamente significativos. Los genes con un valor de tasa de cambio (\log_2) negativo se consideran reprimidos, mientras los que presentan un valor positivo son aquellos genes que se ven activados con el tratamiento de citral o carvacrol.

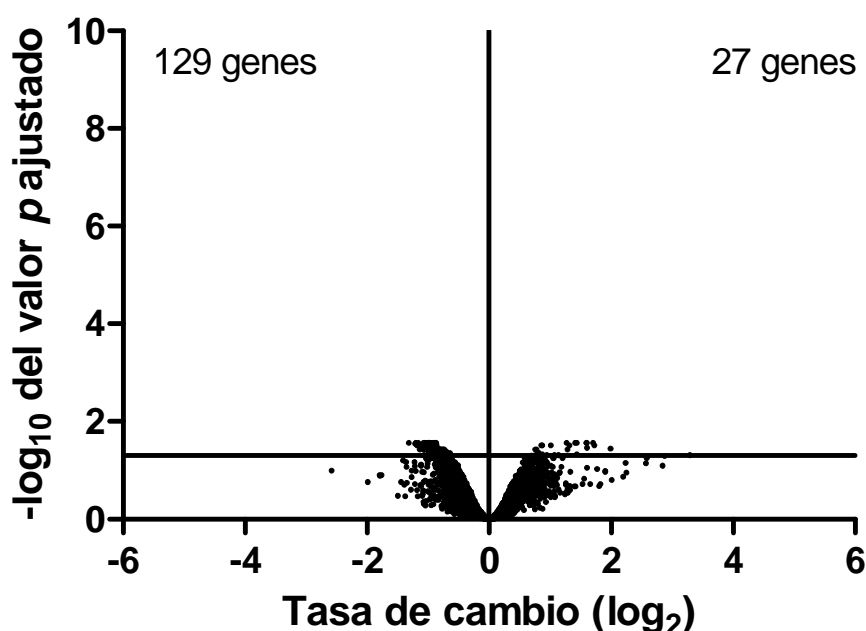


Figura 4. Gráfica de volcán de las diferencias transcripcionales en *Escherichia coli* MG1655 tras el tratamiento con 50 ppm de citral en tampón citrato-fosfato a pH 4,0. Las diferencias individuales se trazan como tasa de cambio \log_2 vs. $-\log_{10}$ ajustado al valor p . Los valores del $-\log_{10}$ del valor p ajustado superiores a 1,3 (que corresponden a $p < 0,05$) indican expresión diferencial con una probabilidad de falso positivo del 5 %. Se indica el número de genes inhibidos o sobre-expresados ($p < 0,05$).

En la tabla 2, se muestran los doce genes más sobre-expresados por el tratamiento con citral. Estos genes están relacionados con diferentes estructuras celulares o rutas metabólicas. Los principales genes sobre-expresados están involucrados en la ruta de síntesis de las bases nitrogenadas de las bases púricas (*purH*)

y pirimidínicas (*pyrB* y *pyrI*), en la transcripción de RNA ribosomal (*sad/nusB*), componentes de la cadena transportadora de electrones generadora de ATP (*sdhA*), de la succinato semialdehído deshidrogenasa (*yneI*) y transportadores ABC de la membrana citoplasmática (*yejF*); además de proteínas cuya función no está confirmada o es desconocida (*yaaX*, *ybiJ*, *ybjM*, *yejG*, e *ygaV*).

Tabla 2. Tasa de cambio (\log_2 FC) de los 12 genes más sobre-expresados durante el tratamiento con citral y descripción de cada uno de ellos. La tasa de cambio se obtuvo mediante microarrays de DNA de células de *E. coli* MG1655 tratadas con 50 ppm de citral en tampón citrato-fosfato a pH 4,0.

Gen	Log ₂ FC	Descripción
<i>purH</i>	1,99	AICAR formil transferasa (Fosforibosil formil glicinamidina ciclo-ligasa).
<i>pyrB</i>	1,07	Aspartato carbamoil transferasa, subunidad catalítica.
<i>pyrI</i>	1,41	Aspartato carbamoil transferasa, subunidad reguladora.
<i>sad/nusB</i>	1,44	Aldehído deshidrogenasa hipotética.
<i>sdhA</i>	0,94	Succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína.
<i>yaaX</i>	1,60	ORF, Proteína hipotética.
<i>ybiJ</i>	3,29	ORF, Proteína hipotética.
<i>ybjM</i>	1,43	ORF, Proteína hipotética.
<i>yejF</i>	1,27	Componente hipotético del sistema transportador de ATP
<i>yejG</i>	1,28	ORF, Proteína hipotética.
<i>ygaV</i>	1,72	Hipotético regulador transcripcional de <i>ygaV</i> .
<i>yneI</i>	1,60	Aldehído-deshidrogenasa como proteína <i>yneI</i> .

4.2.2 Microarrays de DNA de células tratadas con carvacrol.

En el caso del tratamiento con carvacrol (100 ppm, 10 min, pH 4.0), 76 genes mostraron diferencias transcripcionales ($p < 0,05$) cuando se compararon con la expresión génica de las células control (10 min, pH 4.0). De estos 76 genes con diferencias transcripcionales, 15 se hallaban inhibidos y 61 sobre-expresados tras el tratamiento con carvacrol (Figura 3).

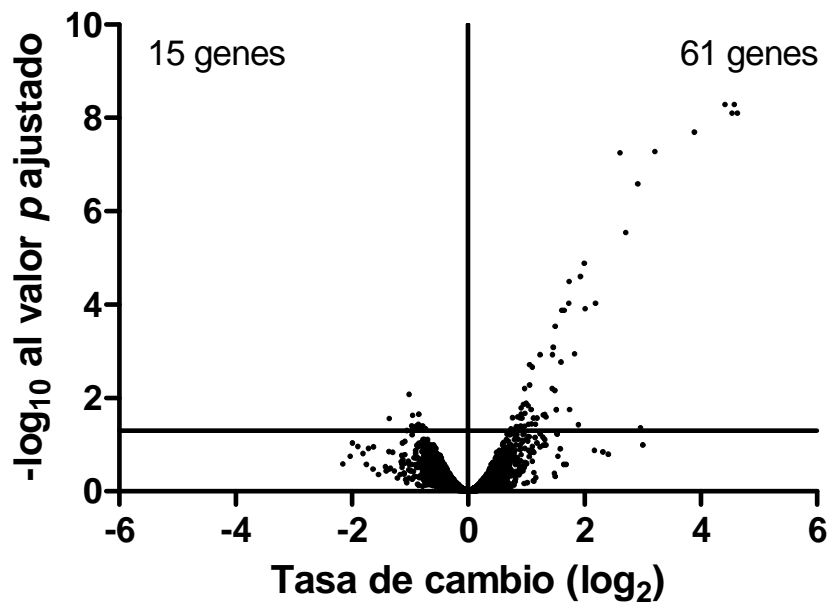


Figura 5. Gráfica de volcán de las diferencias transcripcionales en *Escherichia coli* MG1655 tras el tratamiento con 100 ppm de carvacrol en tampón citrato-fosfato a pH 4,0. Las diferencias individuales son trazadas como tasa de cambio \log_2 vs. $-\log_{10}$ ajustado al valor p . Los valores del $-\log_{10}$ del valor p ajustado superiores a 1,3 (que corresponden a $p < 0,05$) indican expresión diferencial con una probabilidad de falso positivo del 5 %. Se indica el número de genes inhibidos o sobre-expresados ($p < 0,05$).

En la tabla 3, se muestran los 17 genes más sobre-expresados por el tratamiento con carvacrol. Estos genes están relacionados con la biosíntesis de purinas (*purC* y *purM*), ornitina (*argC*), arginina (*argG*) y producción de bacteriocina colicina V (*cvpA*); también, genes involucrados en la síntesis de proteínas producidas en las respuestas de estrés reguladas por el pH (*inaA*) o por la infección de fagos (*pspA*, *pspB*, *pspC*, *pspD*, *pspF* y *pspG*). Además, son componentes de transportadores ABC de L-arginina (*artJ*), de zinc (*znuC*) y de bombas de expulsión de drogas (*acrA* y *mdtM*), así como genes que codifican proteínas con función desconocida (*ygaV*).

Tabla 3. Tasa de cambio (\log_2 FC) de los 17 genes más sobre-expresados durante el tratamiento con carvacrol y descripción de cada uno de ellos. La tasa de cambio se obtuvo mediante microarrays de DNA de células de *E. coli* MG1655 tratadas con 100 ppm de carvacrol en tampón citrato-fosfato a pH 4,0.

Gen	Log ₂ FC	Descripción
<i>acrA</i>	1,87	Bomba de flujo multi fármacos.
<i>argC</i>	2,61	N-acetyl-gamma-glutamyl fosfato reductasa NAD(P)-unión.
<i>argG</i>	2,00	Arginosuccinatosintetasa.
<i>artJ</i>	2,71	Canal iónico de transporte de arginina.
<i>cvpA</i>	1,65	Proteína de membrana necesaria para la producción de colicina V.
<i>inaA</i>	2,19	Proteína inducible por pH involucrada en la respuesta al estrés.
<i>mdtM</i>	1,52	Sistema bomba de flujo multi fármaco.
<i>pspA</i>	4,57	Proteína reguladora del operon <i>psp</i> .
<i>pspB</i>	4,42	Regulador transcripcional de unión al DNA del operon <i>psp</i> .
<i>pspC</i>	3,21	Activador transcripcional de la proteína <i>psp</i> .
<i>pspD</i>	2,92	Proteína de shock de infección por fagos inherente a la membrana periférica.
<i>pspF</i>	1,60	Activador transcripcional de unión al DNA del operon <i>psp</i> .
<i>pspG</i>	4,63	Proteína G del shock por infección por fagos.
<i>purC</i>	1,83	Sintetasa SAICAR (succinylaminoimidazolecarboxamida).
<i>purM</i>	2,01	Sintetasa AIR (Fosforibosilformilglicinamidina ciclo-ligasa).
<i>ygaV</i>	1,75	Regulador transcripcional hipotético de YgaV.
<i>znuC</i>	1,52	Subunidad transportadora de zinc: Componente de la súper familia de sistemas transportadores de unión de ATP.

4.3 Comprobación del análisis transcriptómico mediante RT qPCR.

4.3.1 Análisis transcriptómico de células expuestas a citral por RT qPCR.

Para verificar los resultados del análisis transcriptómico por microarrays de DNA, se realizó una RT qPCR de los 12 genes que habían presentado una mayor tasa de

cambio positiva en la expresión tras el tratamiento con citral (*purH*, *pyrB*, *pyrI*, *sad*, *sdhA*, *yaaX*, *ybiJ*, *ybjM*, *yejF*, *yejG*, *ygaV* e *yneI*).

La figura 4 muestra el ratio de expresión relativa de cada gen estudiado. Los genes están sobre-expresados cuando los valores del ratio de expresión relativa son positivos y los genes están reprimidos cuando los valores del ratio de expresión relativa son negativos.

Al comparar los resultados del ratio de expresión relativa de la RT qPCR tras el tratamiento con citral (50 ppm, 10 min, pH 4.0) con los de las células control (10 min, pH 4.0), 10 genes se mostraron sobre-expresados, destacando *purH*, *pyrI*, *sdhA*, *yejF*, *yejG* e *yneI*, cuya ratio de expresión relativa fue mayor a 1 (Figura 4). Sin embargo, *sad/nusB* e *ygaV*, presentaron una regulación negativa (Figura 6), a pesar que los resultados de los microarrays de DNA mostraban (Tabla 2).

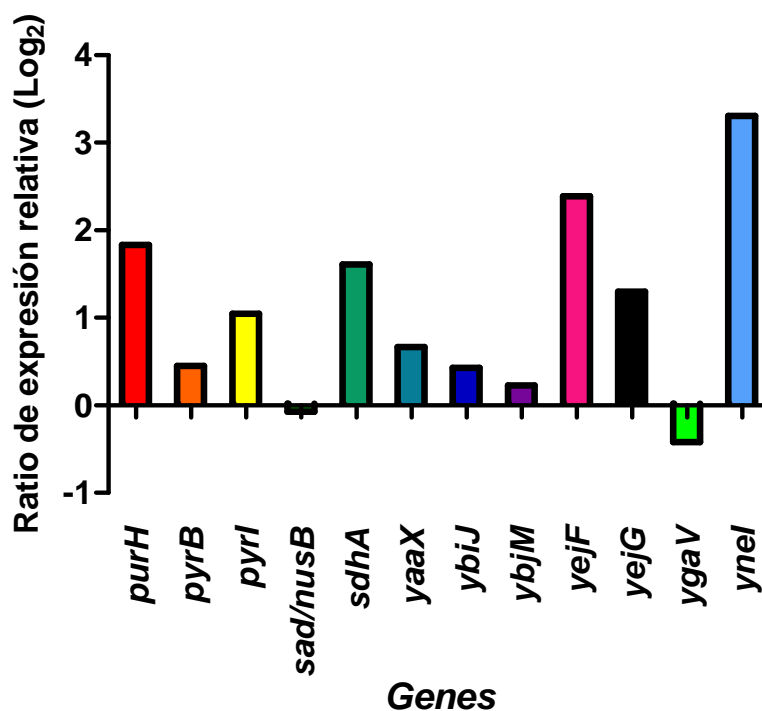


Figura 6. Ratio de expresión relativa (Log₂) génica de *E. coli* MG1655 tras un tratamiento en tampón citrato-fosfato pH 4,0 durante 10 minutos con 50 ppm de citral respecto a las condiciones control en ausencia de citral (tampón citrato-fosfato pH 4,0 10 minutos). Los resultados se corresponden con las medias de, al menos, dos réplicas biológicas realizadas en las mismas condiciones.

4.3.2 Análisis transcriptómico de células expuestas a carvacrol por RT qPCR.

Del mismo modo, los 17 genes que se mostraron más sobre-expresados tras el tratamiento con carvacrol mediante el análisis con microarrays de DNA (*acrA*, *argC*, *argG*, *artJ*, *cvpA*, *inaA*, *mdtM*, *pspA*, *pspB*, *pspC*, *pspD*, *pspF*, *pspG*, *purC*, *purM*, *ygaV*, *znuC*) se seleccionaron para comprobar su expresión mediante RT qPCR.

Al comparar los resultados del ratio de expresión relativa de la RT qPCR tras el tratamiento con carvacrol (100 ppm, 10 min, pH 4.0) con los de las células control (10 min, pH 4.0), 9 genes se mostraron sobre-expresados, destacando *acrA*, *pspB* y *pspC*, cuya ratio de expresión relativa fue mayor a 1 (Figura 4). Sin embargo, *argC*, *mdtM*, *pspA*, *pspD*, *pspF*, *pspG*, *purC*, *purM* e *ygaV* presentaron una regulación negativa (Figura 7), a pesar que los resultados de los microarrays de DNA mostraban (Tabla 3).

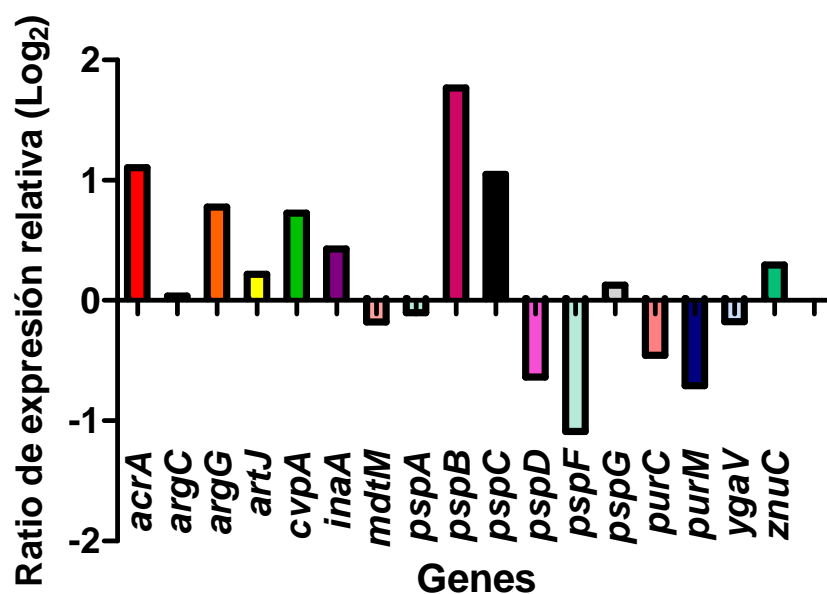


Figura 7. Ratio de expresión relativa (Log₂) génica de *E. coli* MG1655 en tampón citrato-fosfato pH 4.0 durante 10 minutos con 100 ppm de carvacrol respecto a las condiciones control (tampón citrato-fosfato pH 4.0, 10 min). Los resultados mostrados son las medias de, al menos, dos réplicas biológicas realizadas en las mismas condiciones.

4.4 Evaluación de la resistencia al citral de mutantes deletéreos.

Dado que el estudio de la influencia de la delección de los genes sobre-expresados en la resistencia al carvacrol ya se había realizado con anterioridad por el grupo de investigación, en este trabajo, una vez determinados los genes sobre-expresados por el tratamiento de citral en *E. coli* MG1655, se evaluó la resistencia a este compuesto de los mutantes deletéreos de *E. coli* BW25113

Se seleccionaron 12 cepas mutantes deletéreas simples de la colección Keio de cada uno de los genes que más mostraron en los estudios de transcriptómica: $\Delta purH$, $\Delta pyrB$, $\Delta pyrI$, $\Delta sad/nusB$, $\Delta sdhA$, $\Delta yaaX$, $\Delta ybiJ$, $\Delta ybjM$, $\Delta yejF$, $\Delta yejG$, $\Delta ygaV$ y $\Delta yneI$. Con objeto de determinar la influencia del gen deleccionado en la resistencia al citral, los resultados de las cepas mutantes se compararon con la cepa parental.

Tras evaluar diferentes tiempos y concentraciones, se llevó a cabo un tratamiento de inactivación con 200 ppm de citral durante 60 minutos en tampón citrato-fosfato a pH 4,0 (Figura 8) con el fin de detectar una posible sensibilización en las cepas mutantes respecto a la parental.

En la figura 6 se muestran los resultados de inactivación en las células recuperadas en medio no selectivo (TSAEL). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la cepa parental y las mutantes estudiadas, es decir, el daño letal fue el mismo.

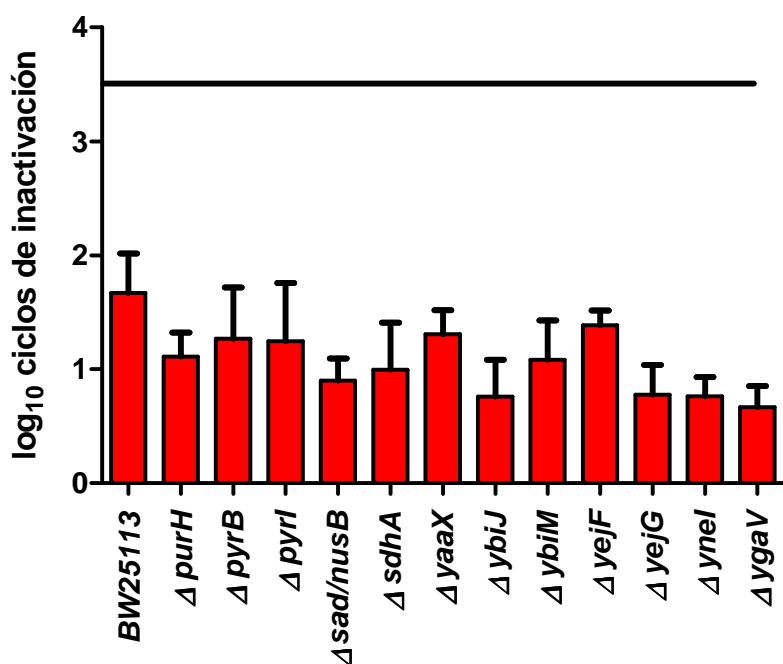


Figura 8. Ciclos de inactivación (Log_{10}) de la cepa parental *E. coli* BW25113 y doce mutantes deletéreas de la cepa parental en fase estacionaria tras el tratamiento con 200 ppm de citral en medio tampón citrato-fosfato a pH 4,0 durante 60 minutos. Las células supervivientes se recuperaron en medio no selectivo (TSAEL). La concentración celular inicial se ajustó a 10^7 UFC/mL para todos los experimentos. La línea marca el límite de detección de inactivación de la técnica utilizada (3,5 ciclos logarítmicos de inactivación). Los datos mostrados se corresponden con la media \pm SEM (barras de error) de tres réplicas biológicas en las mismas condiciones.

Cuando las células se sembraron y recuperaron en medio selectivo (TSAEL-CS) para evaluar las células con daños subletales en su membrana plasmática (Figura 9), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la cepa parental y las mutantes deletéreas. De todos modos, la tendencia apunta que la cepa deletérea en *yejF* mostraba una menor resistencia en su membrana plasmática frente a los tratamientos de citral.

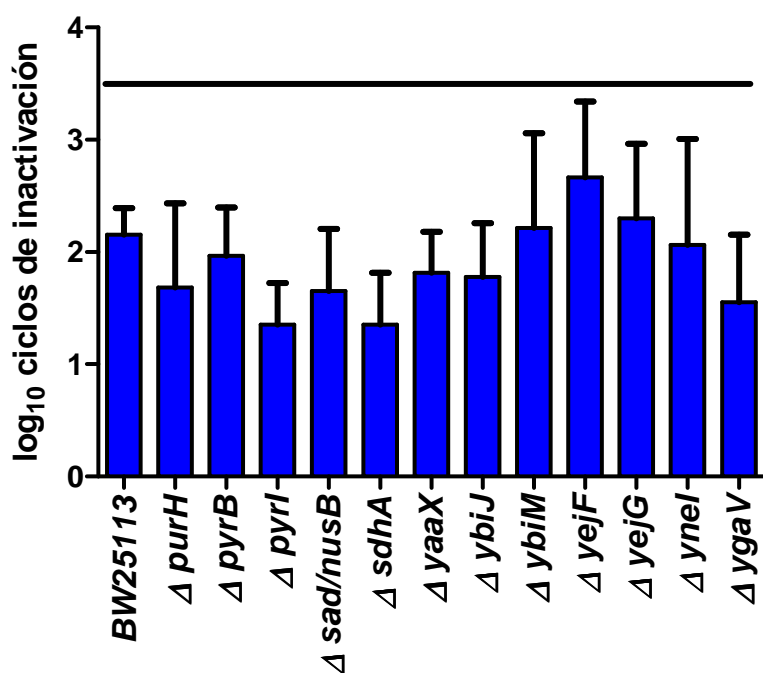


Figura 9. Ciclos de inactivación (Log_{10}) de la cepa parental *E. coli* BW25113 y doce mutantes deletéreas de la cepa parental en fase estacionaria tras el tratamiento con 200 ppm de citral en medio tampón citrato-fosfato a pH 4,0 durante 60 minutos. Las células supervivientes se recuperaron en medio selectivo (TSAEL-CS 4%). La concentración celular inicial se ajustó a 10^7 UFC/mL para todos los experimentos. La línea marca el límite de detección de inactivación de la técnica utilizada (3,5 ciclos logarítmicos de inactivación). Los datos mostrados se corresponden con la media \pm SEM (barras de error) de tres réplicas biológicas en las mismas condiciones.

Para observar el daño subletal en la membrana externa los supervivientes al tratamiento se sembraron en medio selectivo con sales biliares (TSAEL-SB) (Figura 10), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). La inactivación obtenida en el mutante $\Delta purH$ excedió el límite de detección del método empleado.

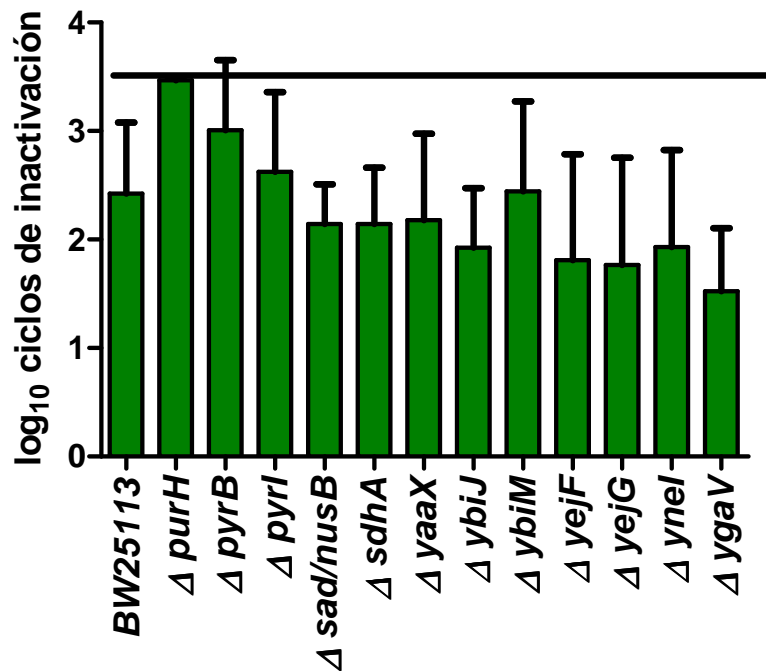


Figura 10. Ciclos logarítmicos de inactivación (Log_{10}) de la cepa parental *E. coli* BW25113 y seis mutantes deletéreas de la cepa parental en fase estacionaria tras el tratamiento con 200 ppm de citral en medio tampón citrato-fosfato a pH 4,0 durante 60 minutos. Las células supervivientes se recuperaron en medio selectivo (TSAEL-SB 0,2%). La concentración celular inicial se ajustó a 10^7 UFC/mL para todos los experimentos. La línea marca el límite de detección de inactivación de la técnica utilizada (3,5 ciclos logarítmicos de inactivación). Los datos mostrados se corresponden con la media \pm SEM (barras de error) de tres réplicas biológicas en las mismas condiciones.

5. Discusión.

La inactivación microbiana mediante compuestos antimicrobianos, tales como el citral o el carvacrol, depende, entre otros, de tres factores: pH del medio de tratamiento, concentración celular del inóculo inicial y del tiempo de tratamiento (Somolinos *et al.* 2010). Teniendo en cuenta estas variables, para este estudio se escogieron las siguientes condiciones:

- a) Una concentración microbiana inicial de 10^7 UFC/mL, con objeto de poder comparar los resultados con otros estudios previos de nuestro grupo de investigación (Espina *et al.*, 2010; Somolinos *et al.*, 2010; Ait-Ouazou *et al.*, 2013; Chueca *et al.*, 2014; Chueca *et al.*, 2015).
- b) El tratamiento se realizó en un tiempo breve de 10 minutos para conseguir unos datos del transcriptoma de *E. coli* que reflejasen la respuesta bacteriana inmediata al estrés tras la exposición.
- c) Y se seleccionó un medio de tratamiento de pH ácido (tampón citrato-fosfato pH 4,0) con la idea de poder aplicar los conocimientos alcanzados en tratamientos de conservación de alimentos con pH bajo.

De este modo, se consiguió tratar a las células en las condiciones más adecuadas para conseguir que la mayor parte de las células fueran capaces de responder a las condiciones de estrés aplicadas (50 ppm de citral o 100 ppm de carvacrol, 10 min, tampón citrato-fosfato pH 4,0).

Los resultados de la determinación del efecto del citral y carvacrol en el transcriptoma de *E. coli* MG1655, mediante microarrays de DNA, mostraron que las bacterias tratadas con carvacrol activaron la expresión de un mayor número de genes (61 genes sobre-expresados; Figura 5) que las células tratadas con citral (27 genes sobre-expresados; Figura 4). Por tanto, aparentemente, el tratamiento con carvacrol activó un mayor número de respuestas celulares al estrés que el tratamiento con citral. Además, la magnitud de la regulación positiva provocada por el tratamiento con carvacrol (Tabla 4) fue mayor que los patrones que se presentaron en la con citral (Tabla 5). Estos resultados mostrarían que los daños ocasionados por el carvacrol eran de mayor magnitud que los provocados por el citral, y/o el número de dianas afectadas por carvacrol era mayor que las del citral.

Los microarrays revolucionaron la forma de medir la expresión génica proporcionando la posibilidad de medir los niveles de transcritos del conjunto del genoma, es decir, del RNA que producía la célula ante la respuesta de estrés (Frazee *et al.*, 2014). La desventaja de esta técnica es que en el análisis por microarrays se confía en la hibridación con sondas predefinidas por secuenciación explícitamente de transcritos (Frazee *et al.*, 2014). Por ello, se consideró conveniente comprobar los resultados obtenidos por esta técnica con la RT qPCR. En el caso del análisis mediante RT qPCR de las células tratadas con citral, se estudiaron 12 genes que se determinaron sobre-expresados por el análisis de microarrays. De estos 12 genes, la sobreexpresión quedó confirmada para 10, descartando la implicación del gen *sad/nusB* y de *ygaV* en la resistencia al citral (Figura 6). En la Tabla 4 se comparan los resultados obtenidos en el análisis mediante RT q-PCR y en microarrays de DNA. En la comprobación mediante RT qPCR los genes *purH* y *yejG* mostraron niveles similares de expresión; *pyrB*, *pyrI*, *yaaX*, *ybiJ* e *ybjM* presentaron niveles de sensiblemente menores; y *sdhA*, *yefF* e *yneI* presentaron mayores niveles de con respecto a los determinados en los microarrays de DNA. En la comprobación de los resultados de transcriptómica obtenidos mediante microarrays de DNA tras la exposición al citral, el gen que mayor regulación positiva mostró fue *yneI*, gen que codifica la succinato semialdehído deshidrogenasa, enzima del metabolismo del nitrógeno. Esta enzima evita la acumulación del compuesto succinato semialdehído que resulta tóxico para la bacteria (Futher *et al.*, 2007) y también se ha visto sobre-expresado en condiciones de estrés ácido (Kannan *et al.*, 2008). El principal grupo de genes relacionados que presentó mayor expresión fue el de la síntesis de purinas (*purH*) y pirimidinas (*pyrB* y *pyrI*), que son esenciales para la síntesis de DNA y RNA. El segundo gen con mayor sobre-regulación fue *yefF*, gen que codifica un péptido componente de un transportador ABC de membrana, YejABEF (Antal *et al.*, 2005). Otro gen que presentó una regulación positiva notable fue *sdhA*, que codifica una subunidad catalítica de las cuatro subunidades de la succinato deshidrogenasa o complejo II mitocondrial que intervienen en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones, generando poder reductor y previniendo la generación de especies reactivas de oxígeno (Yankovskaya *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos sobre la regulación del transcriptoma parecen indicar que la célula responde al estrés generado por el citral aumentando la generación de energía y el metabolismo celular, activando los mecanismos de detoxificación e intentando eliminar el compuesto hacia el exterior celular.

Tabla 4. Comparación entre los valores obtenidos tras el tratamiento de *E. coli* MG1655 con 50 ppm de citral mediante RT qPCR, expresado en ratio de expresión relativa génica (Log_2), y análisis de microarrays de DNA, expresado el logaritmo tasa de cambio en la expresión relativa génica (Log_2 FC). Los resultados mostrados son las medias de, al menos, dos réplicas biológicas.

Genes	RT q-PCR	Microarrays DNA
	Ratio expresión relativa (Log_2)	Tasa de cambio (Log_2 FC)
<i>purH</i>	1,831	1,99
<i>pyrB</i>	0,452	1,07
<i>pyrI</i>	1,047	1,41
<i>sad/nusB</i>	-0,073	1,44
<i>sdhA</i>	1,609	0,94
<i>yaaX</i>	0,663	1,6
<i>ybiJ</i>	0,428	3,29
<i>ybjM</i>	0,225	1,43
<i>yejF</i>	2,388	1,27
<i>yejG</i>	1,299	1,28
<i>ygaV</i>	-0,417	1,72
<i>yneI</i>	3,305	1,6

En el caso de la comprobación de los resultados obtenidos de las células tratadas con carvacrol (Figura 7), se confirmó la de 9 genes: *acrA*, *argG*, *artJ*, *cvpA*, *inaA*, *pspB*, *pspC*, *pspG*, *znuC*, aunque con menores niveles de que en los microarrays de DNA (Tabla 5). Tras la comprobación del análisis transcriptómico por microarrays (Figura 7), los genes que presentaron mayor al tratamiento por carvacrol fueron *pspB* y *pspC*, dos genes involucrados en la síntesis de proteínas de shock por infección de fagos, sistema que responde a un estrés extracitoplasmático (Darwin, 2005) y que es inducido por la disipación de la fuerza motriz-protón (FMP) causada por la producción de secretina (Darwin y Miller, 2001; Darwin, 2005) o tras la exposición a solventes orgánicos hidrofóbicos (Kobayashi *et al.*, 1998). Otros de los genes con mayor son

acrA y *argG*, dos genes relacionados con la biosíntesis de arginina o con el transporte de L-arginina. El aminoácido arginina, junto con la lisina, son los aminoácidos que componen un tercio de los residuos de los canales iónicos. Los monoterpenos, como el carvacrol, afectan a las propiedades físico-químicas de las membranas lipídicas, comportándose como moduladores alostéricos de muchos canales aniónicos (Oz *et al.*, 2015). También, aparecieron sobre-expresados el gen *znuC* relacionado con captación de zinc extracelular (Yamamoto e Ishihama, 2005), y *cvpA* que codifica la bacteriocina colicina V, producida por enterobacterias para inhibir el crecimiento de bacterias similares (Fath *et al.*, 1989). Al igual que en los resultados de la transcriptómica del citral, en la de carvacrol se vio sobre-expresado un gen relacionado con el estrés ácido: *inaA* (White *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos sobre la regulación del transcriptoma tras el tratamiento con carvacrol parecen indicar que la célula respondería al estrés generado mediante la síntesis de canales iónicos o bombas de expulsión para expulsar este compuesto del citoplasma. Por ello, se incrementaría la biosíntesis de aminoácidos que componen los canales iónicos para aumentar el número de ellos en la membrana celular y/o ser capaz de repararlos debido al aumento del tráfico en ellos. Además, el carvacrol parece descompensar el equilibrio extracitoplasmático, frente al que la célula responde con proteínas relacionadas con su protección ante la infección de fagos o bacteriocina para inhibir el crecimiento de otras bacterias.

Tabla 5. Comparación entre los valores obtenidos tras el tratamiento de *E. coli* MG1655 con 100 ppm de carvacrol mediante RT qPCR, expresado en ratio de expresión relativa génica (Log_2), y análisis de microarrays de DNA, expresado el logaritmo tasa de cambio en la expresión relativa génica (Log_2 FC). Los resultados mostrados son las medias de al menos dos réplicas biológicas.

Genes	RT qPCR	Microarrays DNA
	Ratio expresión relativa (Log_2)	Tasa de cambio (Log_2 FC)
<i>acrA</i>	1,106	1,87
<i>argC</i>	0,038	2,61
<i>argG</i>	0,78	2
<i>artJ</i>	0,217	2,71
<i>cvpA</i>	0,728	1,65
<i>inaA</i>	0,428	2,19
<i>mdtM</i>	-0,179	1,51
<i>pspA</i>	-0,103	4,57
<i>pspB</i>	1,77	4,42
<i>pspC</i>	1,049	3,21
<i>pspD</i>	-0,634	2,92
<i>pspF</i>	-1,089	1,6
<i>pspG</i>	0,129	4,63
<i>purC</i>	-0,456	1,83
<i>purM</i>	-0,708	2,01
<i>ygaV</i>	-0,175	1,75
<i>znuC</i>	0,294	1,52

La recuperación de las células tratadas con 200 ppm de citral durante 60 minutos en medios no selectivo y selectivos (TSAEL-SB y TSAEL-CS) no mostró diferencias significativas entre la cepa parental y las mutantes deletéreas simples de los genes más sobre-expresados (Figura 8, 9 y 10). Estos resultados mostrarían que ninguno de estos genes estudiados están implicados por sí solos en la resistencia al citral. Podría ser que una respuesta celular adecuada frente al citral requiera de la expresión de varios de estos

genes, y que ante la falta de una de estas proteínas la célula utilice vías alternativas para elaborar su respuesta y permitir su supervivencia. La verificación de esta hipótesis requeriría de la comparación del transcriptoma de las células de la cepa parental con el de las células mutantes para detectar estas vías alternativas de expresión. Por otro lado, la creación de dobles o triples mutantes deletéreos en varios de estos genes también permitiría detectar el grupo de genes que elaboran esta respuesta conjunta.

Este Trabajo de Fin de Máster ha requerido la puesta a punto de la metodología necesaria para la evaluación de la expresión génica de *Escherichia coli* mediante RT qPCR. Los resultados de esta investigación han requerido del uso conjunto de varias técnicas de microbiología, tanto moleculares como tradicionales. De este modo, a través de los microarrays de DNA se pudo obtener una visión global de la respuesta celular, señalando diferentes genes candidatos que fueron validados por RT qPCR. A partir de estos resultados, se evaluó la resistencia de células mutantes deletéreas para verificar el papel independiente de los genes en la resistencia celular al citral mediante técnicas de microbiología tradicional, como es la siembra en diferentes medios de recuperación. Esta investigación demuestra la importancia e interés del uso conjunto de diferentes técnicas microbiológicas para evaluar el mecanismo de inactivación microbiana por compuestos de aceites esenciales.

6. Conclusiones

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

1. Los resultados de la determinación del efecto del citral y carvacrol en el transcriptoma de *E. coli* MG1655, mediante microarrays de DNA, mostraron que las bacterias tratadas con carvacrol activaron la expresión de un mayor número de genes (61 genes sobre-expresados) que las células tratadas con citral (27 genes sobre-expresados). Estos resultados mostrarían que los daños ocasionados por el carvacrol eran de mayor magnitud que los provocados por el citral, y/o el número de dianas afectadas por carvacrol era mayor que el del citral.
2. La verificación de la expresión de los genes seleccionados a partir del análisis por microarrays de DNA realizada mediante RT qPCR sobre las células tratadas con citral confirmó la de 10 genes (*purH*, *pyrB*, *pyrI*, *sdhA*, *yaaX*, *ybiJ*, *ybjM*, *yejF*, *yejG* e *yneI*), descartando la implicación del gen *sad/nusB* y de *ygaV* en la resistencia al citral en las condiciones estudiadas. En el caso de la comprobación de los resultados obtenidos de las células tratadas con carvacrol, se confirmó la de 9 de ellos: *acrA*, *argG*, *artJ*, *cvpA*, *inaA*, *pspB*, *pspC*, *pspG* y *znuC*.
3. Los resultados de expresión génica indican que la célula responde al estrés generado por el citral mediante la generación de energía y el aumento del metabolismo celular, activando los mecanismos de detoxificación e intentando eliminar el compuesto hacia el exterior celular. Por otro lado, la célula respondería al estrés generado por el carvacrol mediante la síntesis de canales iónicos o bombas de expulsión para expeler este compuesto del citoplasma. Por ello, se incrementa la biosíntesis de aminoácidos que componen los canales iónicos para aumentar su número en la membrana celular y/o ser capaz de repararlos debido al aumento del tráfico en ellos. Además, el carvacrol parece descompensar el equilibrio extracitoplasmático, frente al que la célula responde con proteínas relacionadas con su protección ante la infección de fagos o bacteriocina para inhibir el crecimiento de otras bacterias.
4. Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la resistencia bacteriana frente al citral en diferentes medios de recuperación no mostró diferencias significativas entre la cepa parental y las mutantes deletéreas simples de los genes más sobre-

expresados. Estos resultados indicarían que ninguno de estos genes estudiados están implicados por sí solos en la resistencia al citral, si no que probablemente sería necesaria una acción conjunta de varios de estos genes para elaborar una respuesta adecuada frente a este compuesto antimicrobiano.

7. Referencias bibliográficas.

- Ait-Ouazzou A, Espina L, García-Gonzalo D, Pagán R. Synergistic combination of physical treatments and carvacrol for *Escherichia coli* O157: H7 inactivation in apple, mango, orange, and tomato juices. *Food Control* 2013;32(1):159-167.
- Antal M, Bordeau V, Douchin V, Felden B. A small bacterial RNA regulates a putative ABC transporter. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(9):7901-7908.
- Aruoma OI, Spencer JPE, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, et al. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs. *Food and Chemical Toxicology* 1996;34(5):449-456.
- Ayala G, Chihu L, Perales G, Fierros-Zárate G, Hansen LM, Solnick JV, et al. Quantitation of *H. pylori* cytotoxin mRNA by real-time RT-PCR shows a wide expression range that does not correlate with promoter sequences. *Microbial Pathogenesis* 2004;37(3):163-167.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2006;2.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46(2):446-475.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 1995;57:289-300.
- Blattner FR, Plunkett III G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997;277(5331):1453-1462.
- Botteldoorn N, Van Coillie E, Grijspeerdt K, Werbrouck H, Haesebrouck F, Donné E, et al. Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. *Journal of Microbiological Methods* 2006;66(1):125-135.
- Bowman JP, Bittencourt CR, Ross T. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology* 2008;154(2):462-475.
- Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* 2004;94(3):223-253.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;25(2):169-193.

- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control* 2015;54:111-119.
- Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S, Abee T. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 2010;76(10):3352-3360.
- Chueca B, Pagán R, García-Gonzalo D. Oxygenated monoterpenes citral and carvacrol cause oxidative damage in *Escherichia coli* without the involvement of tricarboxylic acid cycle and Fenton reaction. *International Journal of Food Microbiology* 2014;189:126-131.
- Chueca B, Pagán R, García-Gonzalo D. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* MG1655 cells exposed to pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2015;29:78-86.
- Condón S, Palop A, Raso J, Sala FJ. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 1996;22(2):149-152.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 1999;29(2):130-135.
- Darwin AJ. The page-shock-protein response. *Molecular Microbiology*. 57(3) ed.; 2005. p. 621-628.
- Darwin AJ, Miller VL. The *psp* locus of *Yersinia enterocolitica* is required for virulence and for growth in vitro when the Ysc type III secretion system is produced. *Molecular Microbiology* 2001;39(2):429-444.
- Deng X, Li Z, Zhang W. Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology* 2012;30(1):311-315.
- Eleaume H, Jabbouri S. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during in vitro growth. *Journal of Microbiological Methods* 2004;59(3):363-370.
- Espina L, Somolinos M, Pagán R, García-Gonzalo D. Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *Journal of Food Protection* 2010;73(12):2189-2196.
- Espina L, Monfort S, Álvarez I, García-Gonzalo D, Pagán R. Combination of pulsed electric fields, mild heat and essential oils as an alternative to the ultrapasteurization of liquid whole egg. *International Journal of Food Microbiology* 2014;189:119-125.

- Fath MJ, Mahanty HK, Kolter R. Characterization of a *purF* operon mutation which affects colicin V production. *Journal Bacteriology* 1989;171(6):3158-3161.
- Frazer, A.C. Sabunciyan, S. Hansen, K.D. Irizarry and R.A Leek, J.T. Differential expression analysis of RNA-seq data at single-base resolution. *Biostatistics* 2014;15(3):413-236.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. 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* 2002;65(10):1545-1560.
- Friedman, O. Goldberg, A. Ronin, I. et al. Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature* 2014;519(7518):418-421.
- Fuhrer T, Chen L, Sauer U, Vitkup D. Computational prediction and experimental verification of the gene encoding the NAD⁺/NADP⁺-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Journal Bacteriology* 2007;189(22):8073-8078.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 2004;5(10).
- Gill AO, Holley RA. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal Food Microbiology* 2006;108(1):1-9.
- Guernec A, Robichaud-Rincon P, Saucier L. Whole-genome transcriptional analysis of *Escherichia coli* during heat inactivation processes related to industrial cooking. *Applied and Environmental Microbiology* 2013;79(16):4940-4950.
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiology* 2012;3(JAN).
- Jones FA. Herbs - useful plants. Their role in history and today. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1996;8(12):1227-1231.
- Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Review* 2008;32(1):107-146.
- Kabara JJ, Eklund, T. "Organic acids and esters". In: Russell NJG, N.J., editor. Glasgow, Reino Unido: Blackie y Son Ltd.; 1991. p.44-71.
- Kannan G, Wilks JC, Fitzgerald DM, Jones BD, BonDurant SS, Slonczewski JL. Rapid acid treatment of *Escherichia coli*: Transcriptomic response and recovery. *BMC Microbiology* 2008;8.

- Kobayashi H, Yamamoto M, Aono R. Appearance of a stress-response protein, phage-shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents. *Microbiology* 1998;144(2):353-359.
- Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y. Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural Biology Chemistry* 1981;45(4):945-952.
- Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodiumambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmaniaamazonensis*: A preliminary study. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2007;61(2-3):148-153.
- Nielsen KK, Boye M. Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis of expression stability of *Actinobacilluspleuropneumoniae* housekeeping genes during in vitro growth under iron-depleted conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71(6):2949-2954.
- Onawunmi GO. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters Applied Microbiology* 1989;9(3):105-108.
- Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-, Bégin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 1997;37(2-3):155-162.
- Oz M, Lozon Y, Sultan A, Yang K-S, Galadari S. Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. *Pharmacology and Therapeutics* 2015;152:83-97.
- Park J, Lee H-, Youn K, Kim S, Jung B, Lee J, et al. Transcriptome analyses to understand effects of the *Fusarium* deoxynivalenol and nivalenol mycotoxins on *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 2014(Part A):231-239.
- Pfaffl MW, Hageleit M. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letter* 2001;23(4):275-282.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2002;30(9).
- Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2003;52(5):403-408.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 2004;3(1).

- Somolinos M, García D, Pagán R, Mackey B. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74(24):7570-7577.
- Somolinos M, García D, Condón S, MacKey B, Pagán R. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal Applied Microbiology* 2010;108(6):1928-1939.
- Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. B-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology* 2004;150(11):3843-3855.
- Suhr KI, Nielsen PV. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology* 2003;94(4):665-674.
- Ultee A, Kets EPW, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Journal of Applied Microbiology* 1999;65(10):4606-4610.
- Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, Van Ranst M, Van Eldere J. Use of gDNA as internal standard for gene expression in *Staphylococcus* in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research* 2002;291(3):528-534.
- Vurma, Mustafa Chung, Yoon-Kyung Shellhammer, Thomas H. Turek, Evan J. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 2006;106(3):263-269.
- Wecke T, Mascher T. Antibiotic research in the age of omics: From expression profiles to interspecies communication. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011;66(12):2689-2704.
- White S, Tuttle FE, Blankenhorn D, Dosch DC, Slonczewski JL. pH dependence and gene structure of *inaA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1992;174(5):1537-1543.
- Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler(TM): A microvolumemultisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22(1):176-181.
- Yamamoto K, Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external zinc. *Journal of Bacteriology* 2005;187(18):6333-6340.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 2003;299(5607):700-704.