



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS MICROBIANAS MEDIANTE EL USO DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN NATURAL

Autor/es

ANA FERNÁNDEZ ORTIZ

Director/es

RAFAEL PAGÁN TOMÁS Y DIEGO GARCÍA GONZALO

Facultad de Veterinaria

2015

AGRADECIMIENTOS

Escribir los agradecimientos siempre significa que una etapa se cierra, que el trabajo realizado durante meses está a punto de acabarse y que ha llegado el momento de dar las gracias, tanto a unos como a otros por ayudarme a alcanzar esta meta que me propuse hace un año.

Gracias a mi familia, sin ellos no habría podido llegar hasta aquí ni lo habría conseguido. Gracias por vuestro apoyo incondicional y por aguantarme en mis peores momentos de agobio. Una vez más, os quiero.

Dar las gracias también a mis amigos, no podíais faltar entre estas líneas que tanto me están costando escribir. Los de siempre y los que me han acompañado en esta aventura del máster, me alegro de conoceros, gracias por todos los momentos.

A Diego y Rafa, daros las gracias por muchísimas cosas, pero sobre todo por vuestra dedicación, apoyo y por todo lo que me habéis enseñado como directores.

Gracias a todos los que han aportado su granito de arena para la realización de este Trabajo Fin de Máster y a todo el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, en especial al área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, por brindarme la oportunidad de poder realizar el Trabajo Fin de Máster con vosotros y aprender todo lo posible de microbiología, materia en la que cojeaba un poco.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1 Importancia de la inocuidad de los alimentos.....	6
2.2. Introducción a las biopelículas	7
2.2.1 Etapas de desarrollo de una biopelícula	8
2.2.2 Consecuencias de la presencia de biopelículas en la industria alimentaria	11
2.2.3 Prevención y control de biopelículas	12
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Material y reactivos	19
4.1.1. Material	19
4.1.2. Reactivos	20
4.2. Puesta a punto de la metodología para la formación de biopelículas	20
4.2.1. Formación de biopelículas	20
4.2.2. Técnicas para la cuantificación de biopelículas	21
4.2.3. Influencia de diversos factores en la formación de biopelículas.....	22
4.3. Destrucción de biopelículas por la acción de antimicrobianos	23
4.4. Análisis estadístico de los datos.....	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1. Puesta a punto de la metodología para el estudio de la formación de biopelículas y su cuantificación.....	27
5.1.1. Presencia de glucosa en el medio de cultivo.	27
5.1.2. Volumen de medio de cultivo	29
5.1.3. Tipo de aireación en la estufa de incubación.	30
5.2. Eliminación de biopelículas mediante la acción de antimicrobianos de origen natural.	34
6. CONCLUSIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

1. RESUMEN

Las investigaciones de las últimas décadas han dado a conocer la existencia de otra forma de vida de las bacterias, además de la forma libre (o crecimiento planctónico), consistente en la formación de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. Esta nueva forma de vida de las bacterias se denomina biopelícula (o biofilm). Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen unidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, bajo condiciones ambientales adecuadas.

Actualmente, se sabe que las biopelículas ejercen un gran impacto en diversos ámbitos, y en especial en el ámbito de la seguridad e industria alimentaria.

Las biopelículas, se forman en todo tipo de superficies y pueden contener microorganismos patógenos, lo que aumenta la probabilidad de que el alimento se contamine a lo largo de la cadena alimentaria, pudiendo ser origen de toxiinfecciones alimentarias. Por otro lado, la presencia de biopelículas en los equipos de procesamiento de alimentos también tiene otras consecuencias desde el punto de vista tecnológico en la industria alimentaria. Por este motivo, resulta necesario diseñar procedimientos que permitan la eliminación de todos los microorganismos de las superficies que están en contacto con los alimentos, antes de que puedan establecer una biopelícula que servirá de reservorio y foco de nuevas contaminaciones. Alternativamente, una vez formadas las biopelículas, se requiere su destrucción y eliminación.

A pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas que conforman las biopelículas, pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que procesan los alimentos, por lo que como alternativa a los desinfectantes químicos convencionales, actualmente se está ensayando la eficacia de antimicrobianos de origen natural. Estos agentes antimicrobianos son considerados G.R.A.S (Generalmente Reconocidos como Seguros).

RESUMEN

Con el fin de abordar el estudio de la eliminación de biopelículas ya formadas, en este Trabajo Fin de Máster se ha evaluado de forma *in vitro* la eficacia de 3 agentes antimicrobianos de origen natural, concretamente compuestos individuales de aceites esenciales, carvacrol, citral y óxido de limoneno, con el objetivo final de destruir la biopelícula formada por *Escherichia coli* MG1655 como microorganismo modelo.

Como paso previo, y dado que éste es el primer proyecto en este ámbito del grupo de investigación, se ha puesto a punto la metodología requerida para formar biopelículas y cuantificar posteriormente su destrucción. Durante la puesta a punto de la técnica se ha empleado como método de cuantificación la tinción con cristal violeta en placas micropocillo; y la posterior evaluación de la eficacia de los 3 agentes antimicrobianos se ha cuantificado mediante la técnica de recuento microbiano en placa.

Así, para la formación de la biopelícula se requirió la incubación de los cultivos en placas de 24 pocillos (con 2 mL de medio TSB/pocillo) en estufa de aire estático durante 24 horas a 37 °C.

Los 3 antimicrobianos ensayados (carvacrol, citral y óxido de limoneno) fueron efectivos contra la biopelícula formada por *E. coli* MG1655, en función del pH y de la concentración de antimicrobiano. Así, mientras que el efecto antimicrobiano del carvacrol y del óxido de limoneno frente a las biopelículas fue mayor a pH 4,0, el del citral fue mayor a pH 7,0. Al pH de máxima eficacia, los 3 antimicrobianos lograron reducir en más de 3 ciclos logarítmicos la concentración de microorganismos en las biopelículas, logrando así su práctica destrucción (carvacrol y óxido de limoneno: pH 4,0; citral: pH 7,0).

Así, como resultado de este trabajo, se propone la combinación de moléculas de mayor efectividad a pHs neutros (citral), con moléculas de mayor efectividad a pHs ácidos (en especial carvacrol), para combatir la presencia de biopelículas de *E. coli* en medios de distinto pH. Con este trabajo se inicia una línea de investigación que en un futuro próximo deberá abordar los siguientes retos: la evaluación de la eficacia de estos compuestos sobre otras especies microbianas formadoras de biopelículas, incluyendo bacterias Gram-positivas, patógenos y alterantes de los alimentos, así como el estudio de la eficacia de estos antimicrobianos naturales en combinación con calor.

ABSTRACT

In the last decades, the existence of another form of life from bacteria, in addition to free cells (or planktonic growth), has been discovered. This new form of life from bacteria, known as biofilm, comprises the formation of microbial communities with organization systems typical of the colonial organisms, which grow attached to surfaces and into extracellular matrices (made of exopolysaccharides) synthesized by themselves. These microbial communities grow attached to inert surfaces or live tissue, under suitable environmental conditions.

Currently, the biofilms have a major impact in different fields, especially food safety and industry.

Presence of biofilms, which can contain pathogenic microorganisms, increases the probability of food contamination along the food chain, and it can be the source of foodborne diseases. In addition, the presence of biofilms in food processing equipment has other consequences from a technological point of view. For this reason, it's necessary to design procedures that allow the removal of all microorganisms from surfaces which are in contact with food, before the development of a biofilm that will serve as a reservoir and source of new infections. Alternatively, once formed biofilms, destruction and removal is necessary.

Despite conventional cleaning programs, attached bacteria forming biofilms, can survive and grow on the surfaces of food processing equipment, so as an alternative to conventional chemical disinfectants, effectiveness of natural antimicrobial compounds is currently being tested, such as plant essential oils. These antimicrobial agents are considered G-R-A-S (Generally Recognized As Safe).

In order to approach the study of the removal of biofilms, in this Master's Thesis, it was assessed the *in vitro* antimicrobial efficacy of 3 natural antimicrobial agents, specifically individual compounds of essential oils, carvacrol, citral and limonene oxide, with the final aim of destroying the biofilm formed by *Escherichia coli* MG1655, as model microorganism.

RESUMEN

As a first step, since this is the first project in this field of our research group, it was necessary to tune up the methodology necessary to form biofilms and quantify them after removal was optimized. During the development of the technique the crystal violet staining in micro well plates has been used as a method of quantification; and the subsequent effectiveness of the antimicrobial compounds was quantified using the technique of microbial plate count.

Thus, for biofilm formation incubation of the cultures in 24 wells-plates (2 mL TSB/well) inside a static-air oven for 24 hours at 37 °C was required.

The 3 assayed antimicrobials compounds were effective against biofilm formed by *E. coli* MG1655, as a function of pH and the concentration of the antimicrobial compound. So, while the antimicrobial effect of carvacrol and limonene oxide against biofilms was higher at pH 4,0, the effect of citral was higher at pH 7,0. At the pH of maximum effectiveness (carvacrol and limonene oxide: pH 4,0; citral: pH 7,0), the 3 antimicrobials were able to reduce by more than 3 logarithmic cycles the concentration of microorganisms present in the biofilm, practically achieving their removal.

So, as a result of this work, the combination of molecules more effective at neutral pHs (citral), with molecules more effective at acid pHs (especially carvacrol) is proposed to fight the presence of biofilms of *E. coli* in media of different pH. This work initiates a research line which will face the following tasks in the near future: the evaluation of the efficacy of these compounds on other biofilm forming microbial species, including Gram-positive bacteria, pathogenic and spoiling bacteria of foods, as well as the study of the efficacy of these natural antimicrobials in combination with heat.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Importancia de la inocuidad de los alimentos

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) afirma que son numerosos los factores y situaciones que pueden contribuir a la ruptura o disminución de la seguridad en la alimentación, dando lugar a la aparición de reacciones adversas en los consumidores. Un ejemplo es la acción o presencia de sustancias y agentes externos que se encuentran en el alimento, bien de forma accidental o añadidos intencionadamente, y que pueden causar, entre otros, alergias, intoxicaciones e infecciones afectando gravemente a la salud de los consumidores (AECOSAN, 2010).

Esta situación, que supone la pérdida de la inocuidad de los alimentos, puede ser consecuencia de la contaminación del alimento en cualquier etapa del proceso de producción (“de la granja a la mesa”).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la insalubridad de los alimentos representa un problema, ya que la existencia de enfermedades de transmisión alimentaria se considera un problema de salud pública significativo, de relevancia social y económica, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (OMS, 2015). Estas enfermedades abarcan un amplio rango de tipologías y son desencadenadas por agentes químicos o biológicos, que se encuentran en el alimento en el momento que se consume. Por ello, la gestión de la seguridad alimentaria en todas las fases de la cadena alimentaria resulta crucial para el mantenimiento de la inocuidad de los alimentos.

En las últimas décadas, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, sino que, en muchas ocasiones, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan (Donlan, 2002). A estas estructuras biológicas se las denomina biofilms (o biopelículas). Hoy en día se sabe que las biopelículas no son una rareza, si no que representan una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de la vida humana con múltiples

implicaciones tanto sanitarias como tecnológicas. Estas repercusiones son especialmente importantes en el ámbito de la industria alimentaria, donde su control y eliminación puede representar un problema de seguridad alimentaria, y cuyo abordaje difiere del hasta hoy día aplicado para el control y eliminación de las bacterias en forma planctónica. En cualquier situación, la eliminación de las biopelículas es una tarea muy difícil y exigente que puede resultar sumamente cara y complicada. Para evitar la contaminación de la cadena alimentaria debido a las biopelículas cada industria debería involucrarse en la investigación de su presencia y evaluación del riesgo, así como en el desarrollo de su propia tecnología, dependiendo de las variables inherentes a los diferentes procesos involucrados en la producción de los alimentos que elaboran (AECOSAN, 2010; Srey y col., 2013).

2.2. Introducción a las biopelículas

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen unidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, bajo condiciones ambientales adecuadas. La composición de las biopelículas es variable, no obstante, el componente mayoritario es agua, que puede representar hasta el 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de las biopelículas es un complejo formado por polisacáridos secretados por las células que forman parte de la propia biopelícula (Lasa y col., 2005). Estas comunidades exhiben un fenotipo diferente al de esas mismas células en forma planctónica, es decir, con una forma de vida unicelular, con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes (Donlan, 2002; Shi y col., 2009, Srey y col., 2013).

La percepción de que las bacterias son capaces de formar estructuras biológicas se ha convertido en un aliciente a la investigación sobre las propiedades físicas y químicas de las biopelículas, la caracterización de su morfología y sus formas de desarrollo (Serra, 2003).

Las bacterias forman las biopelículas como estrategia, ya que el crecimiento de las biopelículas aporta cuatro ventajas importantes: 1) protege a los microorganismos de los agentes adversos, 2) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, 3)

facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y, 4) posibilita la transferencia de material genético entre sus células. Todas estas circunstancias pueden incrementar la capacidad de supervivencia de la comunidad microbiana. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias que forman parte de la biopelícula (Donlan, 2002; Simões y col., 2006).

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en diferentes superficies de conducciones, equipos y materiales. Por ello, desde un punto de vista tecnológico, las biopelículas pueden ocasionar problemas diversos como la reducción del flujo de líquidos, la reducción de transmisión de calor, pérdidas energéticas, el bloqueo de los poros de membranas o la corrosión de metales (Serra, 2003). En las líneas de procesamiento de los alimentos, las biopelículas se suelen encontrar adheridas a la superficie de los equipos por los que circula el alimento. La biopelícula que se forma en estas situaciones depende de varios factores para desarrollarse: cepa del microorganismo, propiedades de la superficie del material al que se adhiere, pH, temperatura y nutrientes (Srey y col., 2013).

2.2.1 Etapas de desarrollo de una biopelícula

El proceso de formación de una biopelícula microbiana es muy complejo. En primer lugar, las moléculas orgánicas de los alimentos se depositan en las superficies de los equipos de procesamiento de la industria alimentaria. En segundo lugar, los microorganismos activos se unen a dichas superficies bajo unas condiciones determinadas. En tercer lugar, después de la limpieza y desinfección de los equipos, las células que permanecen vivas, comienzan a crecer. Finalmente, las biopelículas se forman como consecuencia del quorum sensing¹ y la consiguiente expresión génica (Shi y col., 2009).

Las bacterias desarrollan las biopelículas siguiendo cinco pasos, los cuales engloban un proceso dinámico.

¹ Mecanismo de regulación de la expresión génica. Las células implicadas producen y excretan unas sustancias llamadas autoinductores, que sirven de señal química para inducir la expresión génica colectiva. Es una forma de comunicación celular (Casal, 2004).

INTRODUCCIÓN

1) **Unión inicial.** Las bacterias que se unen inicialmente pueden ser activas o pasivas, dependiendo de su movilidad. La unión de la célula a la superficie del equipo se produce en función de las propiedades físico-químicas de la membrana bacteriana (Ferreira y col., 2010).

Al principio, las células adheridas, las cuales originan la biopelícula, excretan solamente una pequeña cantidad de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)², mientras que otras células se encuentran todavía en estado planctónico, moviéndose de manera independiente (O'Toole y col., 2000). En esta etapa, la adhesión a la superficie es reversible ya que los microorganismos no han comenzado a diferenciarse morfológicamente para formar la biopelícula, por lo que algunas de esas células pueden desprenderse de la superficie y volver a ser células planctónicas (Stoodley y col., 2002).

Las propiedades de la superficie de contacto juegan un papel muy importante en la adhesión de las células. Generalmente, cualquier tipo de superficie es vulnerable a la formación de biopelículas (plástico, vidrio, metal, madera y alimentos). La unión de las células a la superficie depende tanto de sus propiedades físico-químicas (su carga eléctrica, su hidrofobicidad, pH, temperatura y la composición en nutrientes del medio en el que se encuentren las células) como de la textura, bien sea rugosa o lisa (Donlan, 2002; Nilsson y col., 2011).

2) **Unión irreversible.** La unión pasa de ser reversible a irreversible como consecuencia del cambio en la interacción entre las bacterias con la superficie de contacto, que pasa de ser débil a ser permanente debido a la presencia de una elevada cantidad de EPS, las cuales unen a las células entre sí, formando microcolonias (Stoodley y col., 2002). Después de que la unión ya sea irreversible, para la posterior eliminación de la biopelícula ya sería necesario aplicar agentes físicos, químicos, enzimas, detergentes, surfactantes, calor, etc. (Augustin y col., 2004).

² Las sustancias poliméricas extracelulares están formadas, principalmente, por polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácido teitoico y ácidos nucleicos (Shi y col., 2009).

INTRODUCCIÓN

3) **Desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula (formación de microcolonias).** Las microcolonias se forman como consecuencia de la acumulación y crecimiento de los microorganismos asociados a la secreción de EPS (Chmielewski y col., 2003), fortaleciendo, de este modo, la unión entre la bacteria y el sustrato y contribuyendo a estabilizar la colonia frente al estrés ambiental (Donlan, 2002).

4) **Maduración.** En esta etapa la biopelícula se desarrolla hasta alcanzar una estructura organizada, si las condiciones son adecuadas. Una biopelícula madura consiste en una simple capa de bacterias, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por EPS. La maduración de la biopelícula depende de la disponibilidad de nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad del agua y del transporte celular. A medida que la biopelícula madura, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y los cambios poblacionales, formando microcolonias separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas periféricas permanecen porosas. Las bacterias con un metabolismo más activo se localizan en la superficie de las capas de la matriz, cerca de los canales de agua. Estos canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos (Davey y col., 2000; Branda y col., 2005).

5) **Dispersión.** Es el último paso del ciclo de formación de la biopelícula y permite el retorno de las células a la forma planctónica (Sauer y col., 2002). Un cambio externo, tal como un incremento del flujo, o un cambio interno, tal como una degradación enzimática o una liberación de EPS o de las proteínas de unión a la superficie, pueden ser las causas por las que se produce el desprendimiento de la biopelícula (Kaplan y col., 2004). El desprendimiento parece ser un proceso activo, el cual permite la colonización de nuevos nichos (O'Toole y col., 2000; Sauer y col., 2002).

Los factores que en mayor medida determinan la formación y desarrollo de una biopelícula son: (Fuster i Valls, 2006; García-Gonzalo y col., 2015).

1. Las propiedades de las superficies de contacto.
2. El tiempo de contacto.
3. Las características de la superficie bacteriana.
4. La disponibilidad de nutrientes.
5. La composición de la comunidad bacteriana.
6. La disponibilidad de agua.
7. Temperatura.
8. Concentración de oxígeno.
9. Composición de la matriz alimentaria.

2.2.2 Consecuencias de la presencia de biopelículas en la industria alimentaria

Como ya se ha señalado, las biopelículas se forman en todo tipo de superficies, y pueden contener microorganismos patógenos, lo que aumenta la probabilidad de que el alimento final esté contaminado, provocando infecciones alimentarias. Por otro lado, la presencia de biopelículas en los equipos de procesado de alimentos tiene consecuencias desde el punto de vista tecnológico, como por ejemplo la reducción del flujo de líquidos, la reducción de transmisión de calor, etc. De manera general, las consecuencias causadas por la formación de biopelículas en la industria alimentaria conllevan a pérdidas económicas, a enfermedades, etc. (Serra, 2003). Esta situación hace que entre las diferentes industrias alimentarias, aumente la preocupación sobre este asunto.

Por este motivo, es necesario eliminar todos los microorganismos de las superficies que están en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y establezcan una biopelícula que servirá de reservorio y foco de nuevas contaminaciones (Serra, 2003; Fuster i Valls, 2006). También, se pueden eliminar las biopelículas una vez ya formados en las superficies que están en contacto con los alimentos. Lo ideal sería prevenir la formación de biopelículas, evitando que éstas se formen; sin embargo, no existe actualmente ningún procedimiento que permita prevenir la formación de biopelículas sin causar efectos adversos (Midelet y col., 2004; Simões y col., 2010).

2.2.3 Prevención y control de biopelículas

El control microbiano en el procesado de los alimentos consiste en reducir y eliminar los microorganismos y su actividad, y por tanto, ello debe incluir la prevención y control de la formación de biopelículas. Hoy en día, los medios prácticos más eficaces para limitar el crecimiento microbiano incluyen la higiene en la producción de alimentos, y el buen uso de productos de limpieza y desinfección. Debido a la resistencia que presentan las biopelículas a la desinfección convencional, se están desarrollando nuevas estrategias de control de biopelículas basadas en el uso de soluciones biológicas con alta actividad antimicrobiana y especificidad (Simões y col., 2010).

A pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que procesan los alimentos; se ha comprobado que las bacterias adheridas son mucho más resistentes a los desinfectantes que las que se hallan en suspensión, y esta resistencia se atribuye al “escudo microbiano”, que componen las biopelículas y a la gran formación de EPS (González, 2005).

El tratamiento de limpieza y desinfección habitual de las biopelículas comprende un tratamiento físico que incorpora una limpieza mecánica y el uso de agua caliente, y un tratamiento químico que implica el uso de biocidas. La limpieza debe disolver la matriz de la biopelícula para que los desinfectantes puedan actuar contra las bacterias (Srey y col., 2013). La resistencia de las biopelículas a la acción de los biocidas parece depender de la estructura tridimensional. Cuanto más viejo y grueso sea, mayor resistencia posee y a la inversa, si se desmonta la estructura pierde resistencia. A continuación, se exponen los biocidas más empleados para la eliminación de las biopelículas: (Edstrom, 2003).

- Biocidas oxidantes:
 - Cloro
 - Dióxido de cloro
 - Ozono
 - Peróxido de hidrógeno

- Biocidas no oxidantes:
 - Compuestos de amonio cuaternario
 - Formaldehído
 - Hipoclorito sódico

Estos agentes utilizados en el proceso desinfección persiguen causar la inactivación microbiana. Sin embargo, la eficacia de los desinfectantes está limitada por la presencia de materia orgánica como grasa, hidratos de carbono y proteínas. Además, el pH, la temperatura, la dureza del agua, los inhibidores químicos, concentración y tiempo de contacto son factores determinantes en la eficacia de los desinfectantes (Cloete y col., 1998; Bremer y col., 2006; Kude y col., 2008; Srey y col., 2013).

En la actualidad, y como alternativa a los desinfectantes químicos tradicionales, se está explorando la eficacia de antimicrobianos de origen natural. Ello responde también a la demanda de los consumidores por productos alimenticios más seguros, pero también más naturales y saludables. Entre los antimicrobianos de origen natural más estudiados destacan los aceites esenciales de especias y hierbas aromáticas, algunos de ellos reconocidos como sustancias GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros).

Al igual que sucede con los desinfectantes tradicionales, también en el caso de los aceites esenciales es importante conocer su mecanismo de acción antimicrobiana, ya que de ello depende su adecuada y correcta aplicación en los alimentos. En términos generales, se atribuye la acción antimicrobiana al deterioro de la membrana celular de los microorganismos, afectando a su permeabilidad, favoreciendo el flujo de protones, la alteración de los sistemas enzimáticos y la producción de energía (Tassou y col., 2000; Gómez-Sánchez y col., 2009). Otros autores afirman que los aceites esenciales podrían inhibir la percepción de quórum, y de este modo, la formación de las biopelículas (Burt y col., 2014).

Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los componentes individuales de los aceites esenciales en la eliminación de las biopelículas, cumpliendo con las necesidades anteriores. Burt y col. (2014) estudiaron el efecto de carvacrol, uno de los principales componentes antimicrobianos del aceite esencial del orégano, sobre la formación de biopelículas y su actividad sobre biopelículas previamente formados. El

INTRODUCCIÓN

carvacrol, aplicado en concentraciones subletales, fue capaz de inhibir la formación de las biopelículas de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Salmonella enterica* subsp. *Typhimurium* DT104 y *Staphylococcus aureus* 0074, mientras que no mostró ningún efecto sobre la formación de las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Por el contrario, el carvacrol, no mostró efecto frente a las biopelículas ya formadas previamente, lo que significa que la biopelícula confiere protección a las bacterias que la forman.

Por otro lado, Szczepanski y col. (2014) analizaron los efectos inhibitorios del aceite esencial de tomillo, orégano y canela en concentraciones subletales sobre la formación de biopelículas de tres cepas microbianas (*Acinetobacter*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*). En este caso, el aceite de tomillo fue capaz de inhibir el desarrollo de las biopelículas a concentración subletal, siendo el más eficaz en comparación con el resto.

Siroli y col. (2015) investigaron las modificaciones que se producían en los ácidos grasos de la membrana celular de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* durante su crecimiento en presencia de concentraciones subletales de aceites esenciales de tomillo y orégano, así como carvacrol, timol, trans-2-hexanol y citral. Los resultados mostraron que todos los agentes antimicrobianos eran capaces de modificar los perfiles de los ácidos grasos de la membrana celular de dichas bacterias. Sandasi y col. (2008) estudiaron el efecto de cinco componentes de aceites esenciales en las biopelículas de dos cepas de *Listeria monocytogenes*. Se trató la biopelícula durante seis horas con cada uno de los componentes de aceites esenciales y se observó que el crecimiento de la biopelícula no disminuía en presencia de estos antimicrobianos pero sí que se reducía su actividad metabólica. Esto es debido a que las biopelículas son más resistentes a los agentes antimicrobianos que las células en forma planctónica (Lewis, 2001).

En resumen, la mayoría de los autores están de acuerdo en que las bacterias, cuando se encuentran formando biopelículas, son más resistentes frente a los agentes antimicrobianos que cuando se encuentran como células planctónicas. En la búsqueda de agentes antimicrobianos que sean seguros, eficaces, económicos y respetuosos con el alimento y el medio ambiente se propone la utilización de nuevos

INTRODUCCIÓN

antimicrobianos de origen natural como alternativa a las estrategias convencionales de limpieza y desinfección en la industria alimentaria.

Este Trabajo Fin de Máster supone el comienzo de una nueva línea de investigación en el área de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. Para ello, ha sido necesario la puesta a punto de la metodología requerida para la formación y eliminación de biopelículas. Como microorganismo modelo se ha elegido la cepa *Escherichia coli* MG1655, debido a que se tiene una gran experiencia en su manejo en forma de cultivos planctónicos, se conoce su resistencia frente a los aceites esenciales, y se cuenta con herramientas moleculares que permitirían en un futuro profundizar en los mecanismos de formación y resistencia de las células que forman parte de las biopelículas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Máster aborda el estudio *in vitro* de la formación de biopelículas por parte del microorganismo *Escherichia coli* para alcanzar los siguientes objetivos:

- Puesta a punto de la metodología requerida para la formación y cuantificación de biopelículas.
- Evaluación de la eficacia de componentes individuales de aceites esenciales, tales como el carvacrol, citral y óxido de limoneno, como agentes antimicrobianos capaces de eliminar biopelículas de *Escherichia coli* MG1655.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material y reactivos

4.1.1. Material

- Tubos de ensayo.
- Tubos de 1,5 mL
- Tubos falcon.
- Placas de cultivo.
- Asas de siembra.
- Frascos de vidrio de 50, 100 y 250 mL.
- Placas de 96 y 24 pocillos.
- Pipetas graduadas estériles de 10 y 50 mL.
- Micropipetas de 20, 100 y 1000 μ L.
- Agitador vórtex.
- Estufa de aire forzado (modelo 207, J.P.Selecta, Bilbao, España).
- Estufa de aire estático (J.P.Selecta).
- Espectrofotómetro (modelo Libra S12, Biochrom, Cambrifge, Reino Unido).
- Fluorímetro (TECAN GENios, Männedorf, Suiza).
- Ultrasonidos (Allendale-ultrasonics.co.uk cavitek profesional series, Hertfordshire, Reino Unido).
- pH metro (modelo BASIC 20+, Crison, Barcelona, España).
- Contador automático de colonias (Protos; Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido).
- GraphPad Software (Inc, San Diego, Estados Unidos).

4.1.2. Reactivos

- Caldo tripticasa de soja (TSB) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
- Agar tripticasa de soja (TSA) (Oxoid).
- Extracto de levadura (YE) (Oxoid).
- Ácido cítrico 1-hidratado PA-ACS-ISO ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Panreac, Barcelona, España).
- Fosfato disódico (Reag.Ph.Eur) PA-ACS. Na_2HPO_4 (Panreac).
- Agua de peptona tamponada (AES Laboratoire, Combourg, Reino Unido).
- D(+)-Glucosa monohidratada (PROLABO, Radnor, Pennsylvania).
- Ácido acético glacial (Reag.Ph.Eur) para análisis, ACS, ISO (CH_3COOH) (Panreac).
- Tween 20.
- Cristal violeta ACS Reagent ≥ 90 % (Sigma Aldrich, San Luis, Estados Unidos).
- Carvacrol ≥ 98 %, FCC, FG (Sigma Aldrich).
- Citral (mezcla cis y trans). 95 % (Sigma Aldrich).
- Óxido de limoneno (+) (mezcla cis y trans). 97 % (Sigma Aldrich).

4.2. Puesta a punto de la metodología para la formación de biopelículas

4.2.1. Formación de biopelículas

La cepa bacteriana empleada fue *Escherichia coli* MG1655. En primer lugar, se realizó un precultivo microbiano. La preparación del precultivo microbiano se realizó inoculándose una colonia, previamente aislada, en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo de cultivo tripticasa de soja (TSB) y se cultivó en agitación a 37 °C durante 12 horas. Posteriormente, se preparó el caldo de cultivo, en el que se inoculó el precultivo en una proporción 1:100. Una vez finalizada la preparación del caldo de cultivo, en una placa de 96 o 24 pocillos (Figura 1 y 2, respectivamente), se inoculó un volumen de 100 μ L o 2 mL, respectivamente del caldo de cultivo correspondiente. Las placas se incubaron durante 24, 48 y 72 horas en una estufa a 37 °C. Transcurrido el tiempo correspondiente de incubación, se descartó el sobrenadante de cada pocillo y se lavó cada pocillo con agua

destilada para eliminar los restos de medio cultivo. Estos pasos se realizaron con cuidado para evitar la pérdida de la biopelícula.

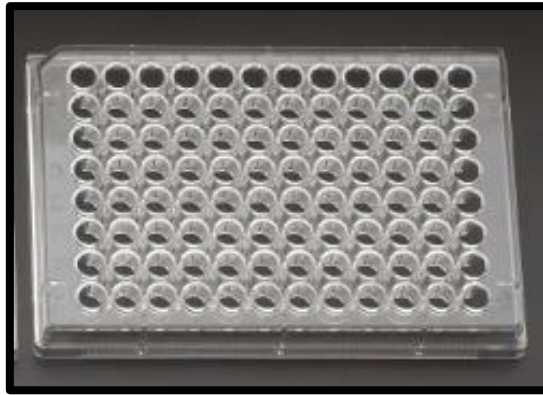


Figura 1. Placa de 96 pocillos



Figura 2. Placa de 24 pocillos

4.2.2. Técnicas para la cuantificación de biopelículas

a) Cuantificación de la biopelícula mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

Una vez lavados los pocillos de la placa micropocillos, éstas se dejaron secar durante 12 horas. Seguidamente, se tiñeron con 125 μ L o 1,5 mL de cristal violeta 0,1%, para la placa de 96 o 24 pocillos, respectivamente y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se lavaron los pocillos y se volvieron a dejar secar las placas durante 12 horas. Transcurridas las 12 horas, se añadieron 125 μ L o 1,5 mL de ácido acético glacial 30% en cada pocillo para cada tipo

de placa y se incubaron 15 minutos para disolver la biopelícula previamente teñida. La biopelícula disuelta se cuantificó en un fluorímetro TECAN GENios, mediante la medida de absorbancia 595 nm (OD₅₉₅).

b) Cuantificación de la biopelícula mediante la técnica de recuento en placa.

Tras el lavado de los pocillos según el punto 4.2.1, se añadieron 1,5 mL de agua de peptona 0,1% a cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Con la ayuda de un asa de siembra se desprendió la biopelícula del pocillo para resuspenderla en el agua de peptona. La biopelícula resuspendida se traspasó a un tubo de 1,5 mL, al que se le añadieron 15 µL de Tween 20. Los tubos de 1,5 mL se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para disgregar las células que conforman la biopelícula. Se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1% y se sembraron 100 µL en placas de cultivo por homogenización en masa en medio de cultivo tripticasa de soja (TSA). Las placas se incubaron durante 24 horas a 35 °C. Transcurrido el tiempo de incubación de las placas de cultivo, se realizó el recuento de colonias mediante un contador de colonias automático (Condón y col., 1996).

4.2.3. Influencia de diversos factores en la formación de biopelículas

Con objeto de obtener una biopelícula reproducible, homogénea y con una densidad microbiana adecuada, se estudió la influencia de diferentes factores en su formación a lo largo del tiempo (24, 48 y 72 horas) mediante la técnica de tinción con cristal violeta.

a) Influencia de la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

El estudio del efecto de la matriz alimentaria se llevó a cabo estudiando el efecto de la glucosa en la formación de la biopelícula. En primer lugar, se incubó el cultivo bacteriano en presencia de glucosa al 1% en caldo de cultivo TSB en placas de 96 pocillos, durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas a 37 °C. Paralelamente, se incubó el cultivo bacteriano

sin presencia de glucosa en las mismas condiciones. Transcurridas las horas correspondientes, se lavó, secó y cuantificó la biopelícula.

b) Influencia del volumen de cultivo.

Siguiendo el mismo protocolo, se ensayó la formación de biopelículas en placas de 24 pocillos en las que el volumen de cultivo (2 mL) fue 20 veces superior al de las placas de 96 pocillos (100 µL).

c) Influencia del tipo de aireación en la estufa de incubación.

Para estudiar el efecto que podían ejercer las condiciones de incubación de las placas micropocillo, se realizó un ensayo en el que se formó la biopelícula en placas de 24 pocillos en dos tipos de estufas, una de aire forzado y otra de aire estático, ambas a una temperatura de 37 °C. La posterior cuantificación se llevó a cabo del mismo modo que en los casos anteriores. Del mismo modo se estudió la influencia de la formación de la biopelícula incubando las placas micropocillo en el interior de una bolsa de plástico impermeable, con el fin de mantener la humedad relativa constante y así evitar la deshidratación del medio de cultivo.

4.3. Destrucción de biopelículas por la acción de antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos estudiados fueron los componentes individuales de aceites esenciales carvacrol, citral y óxido de limoneno.

En primer lugar, se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) de cada antimicrobiano (carvacrol, citral y óxido de limoneno). Esta concentración se determinó inoculando 1 µL de un precultivo de la bacteria en tubos de ensayo que contenían 5 mL de caldo de cultivo TSB (concentración microbiana inicial de 10^9 UFC/mL) y concentraciones crecientes del antimicrobiano correspondiente (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 y 1500 ppm), y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C en agitación. Transcurrido este tiempo, se observó la presencia

de turbidez en los tubos de ensayo (Figura 3). La MIC se corresponde con aquella del tubo con menor concentración de antimicrobiano en el que no se observó turbidez.

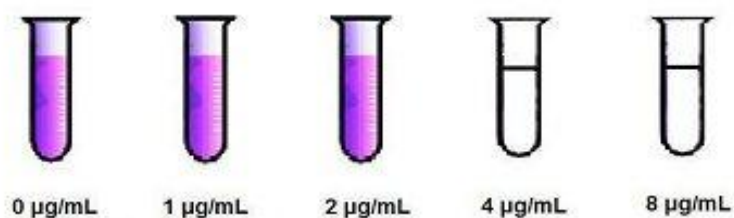


Figura 3. Mínima concentración inhibitoria de carvacrol

En segundo lugar, una vez conocida la MIC de cada antimicrobiano, se formó la biopelícula tal y como se describe en el apartado 4.2.1. A continuación, se procedió a la destrucción de la biopelícula con los antimicrobianos. Se añadieron 125 µL o 2 mL del antimicrobiano en cada pocillo en las placas de 96 o 24 pocillos, respectivamente del antimicrobiano disuelto en tampón McIlvaine de pH 4,0 o 7,0, según corresponda, en concentraciones de 5 y 10xMIC, con el fin de convertir la mínima concentración inhibitoria de crecimiento microbiano en bactericida y así poder eliminar la biopelícula formada. La biopelícula se trató con el antimicrobiano durante 60 minutos a 37 °C. Después del tratamiento se realizó el proceso de lavado de las placas de micropocillos tal y como se describe en el apartado 4.2.1. La cuantificación de la cantidad destruida de biopelícula por parte de los antimicrobianos se realizó por la técnica de recuento en placa. La medida se llevó a cabo por triplicado. Esta técnica se realizó tal y como se ha explicado en el apartado 4.2.2.b.

4.4. Análisis estadístico de los datos

Los datos de los 2 tipos de cuantificación de las biopelículas, se obtuvieron por triplicado. Se calculó la media y la desviación estándar (sd). En algunos casos fue necesario conocer el coeficiente de variación (%), el cual se calcula según la siguiente ecuación:

$$CV (\%) = \frac{sd}{Media} \cdot 100$$

MATERIAL Y MÉTODOS

Por otro lado, se empleó el t-test o análisis ANOVA para detectar diferencias estadísticas, entre los datos, mediante la herramienta GraphPadPRISM®. La significancia estadística de cada uno de ellos se consideró a $p=0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Puesta a punto de la metodología para el estudio de la formación de biopelículas y su cuantificación

Como se ha mencionado anteriormente, ésta fue nuestra primera incursión en el estudio de las biopelículas, por lo que el primer objetivo de este trabajo fue poner a punto la metodología que nos permitiera reproducir tanto la formación de biopelículas como su cuantificación mediante una técnica sencilla. Para ello, se decidió estudiar la formación de biopelículas a lo largo del tiempo de incubación y en presencia o no de glucosa. Como consecuencia de las dificultades metodológicas que fuimos encontrando en el estudio así como en la interpretación de los resultados obtenidos en esta primera fase, se incluyeron como variables el volumen de medio de cultivo y el tipo de aireación en la estufa de desecación, como más adelante se discute. A continuación se muestran los principales resultados.

5.1.1. Presencia de glucosa en el medio de cultivo.

La adición de una fuente de carbono al medio de cultivo sobre la formación de biopelículas ha sido previamente estudiada por Dorel y col (1999). En este estudio, se evaluó la influencia de la presencia de glucosa (1%) en el medio de cultivo en la formación de las biopelículas en placas de 96 pocillos, sin glucosa (control), y en presencia de un 1% de glucosa, durante 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas a 37 °C. En la Figura 4 se muestra el crecimiento de la biopelícula mediante el uso de la técnica de tinción con cristal violeta, a lo largo del tiempo de incubación.

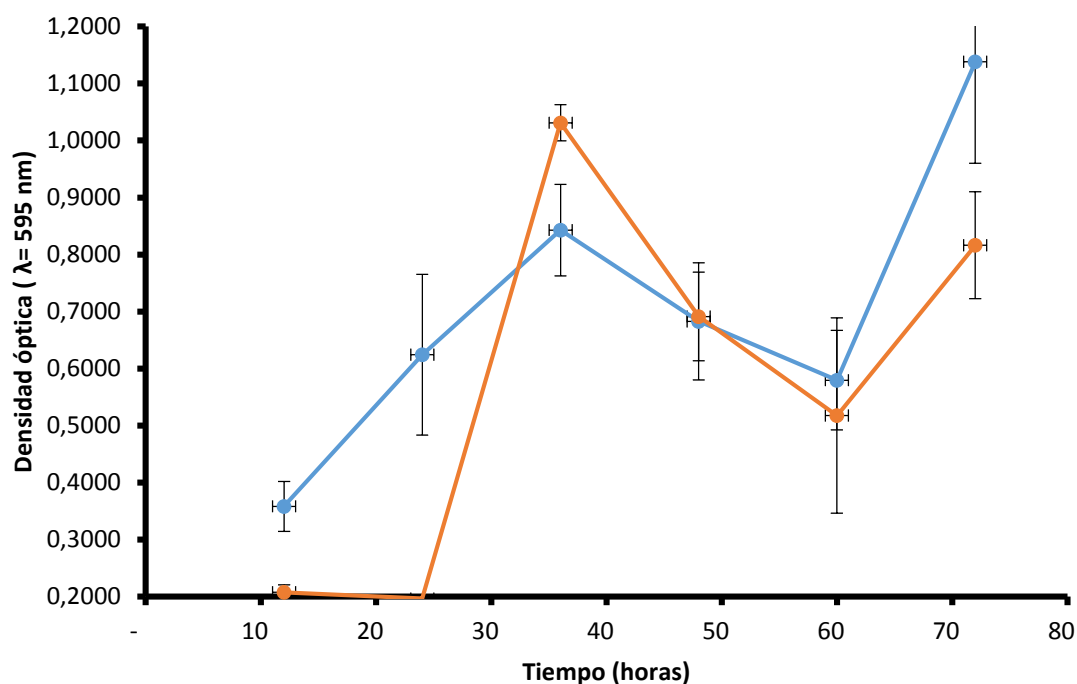


Figura 4. Influencia de la presencia de glucosa (1%) en la formación de la biopelícula de *E. coli* MG1655 en placa de 96 pocillos, (●) TSB; (●) TSB+glucosa (1%).

Como se observa en la Figura 4, el crecimiento de la biopelícula no fue constante durante el periodo de incubación, sino que se sucedieron fases de crecimiento y destrucción de las biopelículas, alcanzándose el máximo de crecimiento tras 36 y 72 horas de incubación en presencia y ausencia de glucosa (1%). Resultados similares han sido previamente descritos por Kadam y col (2013) en la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*, y por Espina y col (2015) en la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus*.

En relación a la influencia de la presencia de glucosa en el medio de cultivo, y a diferencia de lo observado por Dorel y col (1999), la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 no se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) por la presencia de glucosa por lo que se decidió descartar su adición al medio de cultivo en los siguientes experimentos.

Cabe señalar que cada valor obtenido se corresponde con el análisis de la formación de biopelículas en 3 pocillos de la placa. Como se observa en la Figura 4, la desviación estándar entre las muestras para un mismo tiempo y condición de incubación fueron muy

elevadas, lo que indica la dificultad para reproducir la formación de biopelículas en las condiciones establecidas.

5.1.2. Volumen de medio de cultivo

Dada la baja reproducibilidad observada en la formación de las biopelículas en las placas de 96 pocillos (100 μ L), se decidió emplear placas de 24 pocillos, cuyo volumen de ensayo es 20 veces mayor (2 mL), así como también fue mayor la superficie de contacto o adhesión de los microorganismos.

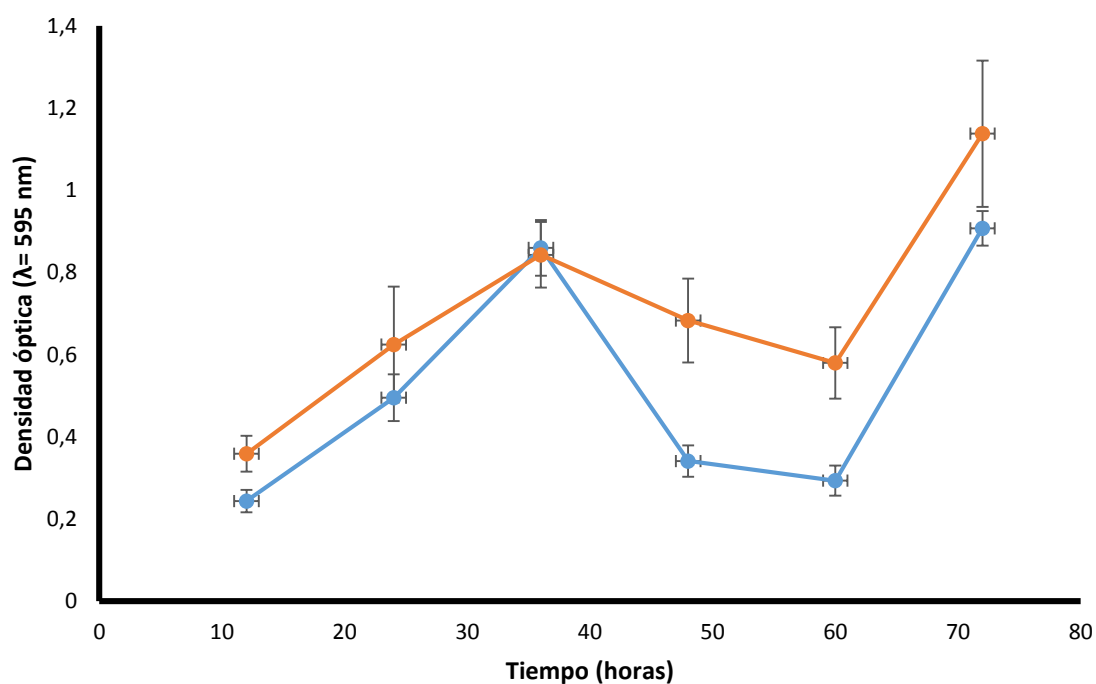


Figura 5. Influencia del volumen de medio de cultivo en la formación de la biopelícula de *E. coli* MG1655 en placa de 24 pocillos, (●) Placa de 24 pocillos (2 mL); (●) Placa de 96 pocillos (100 μ L).

Como se observa en la Figura 5, el perfil de la formación de la biopelícula fue muy similar independientemente de que ésta se formase en un pocillo de 100 μ L o 2 mL, siendo máxima la formación de la biopelícula a las 36 y 72 horas en ambos casos. No obstante,

cabe señalar que las desviaciones estándar obtenidas en las placas de 24 pocillos fueron significativamente inferiores a las obtenidas en las placas de 96 pocillos. La observación de los cultivos durante las 72 horas de incubación a 37 °C nos permitió llegar a la conclusión de que estas diferencias podrían deberse a la deshidratación parcial que los pocillos sufrían durante un periodo de incubación tan largo, siendo ésta mucho mayor e irregular en las placas de 96 pocillos al contener menor volumen de cultivo por pocillo. Por tanto, a partir de estos resultados, y con objeto de confirmar esta hipótesis, se decidió mantener el uso de placas de 96 y 24 pocillos e incluir en el estudio un nuevo factor a considerar en la formación de las biopelículas: el tipo de aireación de las placas en las estufas de incubación. Además, se decidió reducir la matriz experimental, fijándose como tiempos de incubación 24, 48 y 72 horas y tratando de estudiar la influencia de las condiciones de aireación con objeto de conseguir una metodología de formación de biopelículas más reproducible.

5.1.3. Tipo de aireación en la estufa de incubación.

Como se ha mencionado anteriormente, tras la realización de las incubaciones en una estufa de aire forzado durante 72 horas, se observó en repetidas ocasiones, al llevar a cabo el procedimiento de lavado de las placas micropocillo, y previamente a la cuantificación de la formación de la biopelícula por la técnica de tinción con cristal violeta, una deshidratación parcial del medio de cultivo en los pocillos más periféricos de las placas. Esta deshidratación era aparentemente mucho mayor en las placas de 96 pocillos. Por ello, y con objeto de evitar este fenómeno, se decidió ensayar nuevamente la formación de las biopelículas en un ambiente de mayor humedad relativa, lo que inicialmente logramos colocando un vaso de 200 mL de agua en el interior de la estufa de aire forzado (Tabla 1 y 2)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Influencia de la humedad relativa baja en el interior de la estufa de aire forzado en la formación de la biopelícula (OD_{595 nm}).

0,8732	0,8083	0,9674	1,2074	1,2509	1,3836	1,1963	1,3087	1,2915	1,1087	1,4592	1,4252
1,1185	0,8078	0,7362	0,7248	0,6698	0,6657	0,6795	0,7029	0,6316	0,5572	0,6128	1,2819
1,0659	0,5037	0,4995	0,4671	0,4604	0,4189	0,4404	0,5192	0,4834	0,4204	0,5174	1,3828
1,0220	0,5864	0,4896	0,4940	0,5230	0,4143	0,2159	0,2701	0,3798	0,3246	0,5179	1,1722
1,0193	0,5619	0,4584	0,5081	0,4347	0,4335	0,3399	0,4107	0,3762	0,3153	0,5113	1,0636
1,0526	0,6562	0,5616	0,5627	0,4775	0,4961	0,5247	0,4566	0,4116	0,3631	0,5668	1,0608
1,1696	0,7522	0,8554	0,7932	0,8717	0,6488	0,6553	0,6679	0,5921	0,5866	0,7432	1,2629
1,2414	1,4261	1,5377	1,5199	1,3503	1,5067	1,3551	1,3415	1,3596	1,2949	1,3419	1,2532

*La intensidad de color azul está relacionada con los valores de OD_{595nm} de los pocillos, y muestra aquellas áreas de la placa de micropocillos que daban lugar a valores similares.

Tabla 2. Influencia de la humedad relativa alta en el interior de la estufa de aire forzado en la formación de la biopelícula (OD_{595 nm}).

0,9721	0,6600	0,7717	0,6977	0,8116	0,7406	0,7773	0,8298	0,7792	0,7474	0,9481	1,2100
0,6893	0,5244	0,4992	0,5809	0,5155	0,4756	0,5323	0,4394	0,5417	0,5459	0,4590	0,5569
0,5896	0,5281	0,5229	0,5486	0,4384	0,5342	0,4345	0,4007	0,2733	0,2547	0,3429	0,4899
0,5425	0,5447	0,5847	0,5237	0,5255	0,3979	0,3721	0,3127	0,2890	0,2684	0,1316	0,4587
0,5188	0,4599	0,4744	0,5298	0,5099	0,4095	0,4413	0,3518	0,2478	0,2808	0,2353	0,4238
0,4341	0,3309	0,5271	0,4861	0,4782	0,4144	0,4085	0,3816	0,3659	0,2712	0,3276	0,3826
0,6408	0,4587	0,5281	0,4045	0,4928	0,4807	0,4276	0,3665	0,4099	0,4181	0,4008	0,6147
0,7520	0,6083	0,6927	0,7015	0,6564	0,8117	0,7201	0,5690	0,6264	0,6043	0,5823	0,9881

*La intensidad de color azul está relacionada con los valores de OD_{595nm} de los pocillos, y muestra aquellas áreas de la placa de micropocillos que daban lugar a valores similares.

Las Tablas 1 y 2 se corresponden con los valores OD_{595nm} de las placas de 96 pocillos tras su incubación durante 24 horas a 37 °C en una estufa de aire forzado con humedad relativa baja y alta, respectivamente. Como se observa en la Tabla 1, los valores son muy irregulares y poco homogéneos, principalmente los que se encuentran en el marco periférico de la placa, que son muy elevados y se alejan significativamente de la media del conjunto de la placa de pocillos. Por otro lado, en la Tabla 2, a diferencia de la Tabla 1, los datos obtenidos fueron significativamente inferiores, y mostraron mayor homogeneidad entre ellos, pudiéndose decir que se obtuvo en este caso una biopelícula más reproducible en toda la placa micropocillo. Sin embargo, se puede observar que en el marco periférico de la placa de micropocillos, los datos se siguen alejando en mayor o menor medida del promedio del resto de los datos. Por esta razón, en estas primeras fases

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del estudio, no se incluyeron los datos correspondientes a la periferia de las placas en el estudio estadístico de los resultados.

Este simple procedimiento para aumentar la humedad relativa, si bien no se consideró aceptable, ya que la presencia de agua en el interior de la estufa podría dañar su estructura y funcionamiento, nos permitió comprobar la importancia del fenómeno de la deshidratación parcial, por lo que se optó por otras alternativas que la evitasen.

Entre las alternativas que se barajaron, se optó por introducir las placas de micropocillos en bolsas de plástico impermeables para mantener una humedad relativa constante. Al mismo tiempo, se estudió la influencia del tipo de aireación (forzado y estático) en la formación de las biopelículas. El primer estudio realizado tuvo como objetivo la comparación de la formación de las biopelículas en los dos tipos de placas micropocillo, en los dos tipos de estufas de incubación y manteniendo una humedad relativa constante con la ayuda de una bolsa de plástico impermeable. Para ello, se fijó un tiempo único para el estudio, ya que nos interesaba lograr la biopelícula deseada en el menor tiempo posible que permitiera obtener un valor de densidad óptica óptima próximo a 1. Valores de densidad óptica más elevados supondrían la necesidad de tener que hacer diluciones para poder cuantificar la formación de biopelícula, con el consiguiente coste de esfuerzo y tiempo; y valores inferiores reducirían la masa de biopelícula susceptible de ser eliminada por los antimicrobianos (segundo objetivo), disminuyendo la sensibilidad de la técnica en su conjunto. Por todo ello, se fijó un tiempo de incubación de 24 horas. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Densidad óptica (OD_{595nm}) de las biopelículas formadas en placas de 96 pocillos durante 24 horas.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN	Media \pm sd ^a	CV (%) ^b
AIRE ESTÁTICO	0,52 \pm 0,11	22,5
AIRE ESTÁTICO + BOLSA DE PLÁSTICO	0,29 \pm 0,07	24,5
AIRE FORZADO	0,67 \pm 0,35	53
AIRE FORZADO + BOLSA DE PLÁSTICO	0,52 \pm 0,12	23,7

^a Resultados obtenidos de la media de 3 determinaciones \pm sd (desviación estándar).

^b Coeficiente de variación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del tipo de aire aplicado en la estufa de incubación (aire estático y aire forzado) en la formación de las biopelículas en placas de 96 pocillos. No obstante, este estudio mostró que las desviaciones estándar entre los pocillos de las placas de 96 pocillos superaban ampliamente el 20%, revelando la falta de homogeneidad necesaria para cuantificar la formación de biopelículas, por lo que el uso de esta placa de 96 pocillos se descartó definitivamente.

Tabla 4. Densidad óptica (OD_{595nm}) de las biopelículas formadas en placas de 24 pocillos durante 24 horas.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN	Media \pm sd ^a	CV (%) ^b
AIRE ESTÁTICO	0,95 \pm 0,17	18,1
AIRE ESTÁTICO + BOLSA DE PLÁSTICO	1,08 \pm 0,19	18,3
AIRE FORZADO	0,66 \pm 0,19	29,5
AIRE FORZADO + BOLSA DE PLÁSTICO	1,15 \pm 0,16	22,6

^a Resultados obtenidos de la media de 3 determinaciones \pm sd (desviación estándar).

^b Coeficiente de variación.

Como se observa en la Tabla 4, la utilización de placas de 24 pocillos permitió obtener en la mayoría de los casos valores de densidad óptica próximos a 1, y comprobar que la influencia de la utilización de la bolsa de plástico podría ser relevante cuando se empleaba una estufa de aire forzado al reducir considerablemente el coeficiente de variación. Sin embargo, la utilidad de la bolsa de plástico fue insignificante cuando se empleaba una estufa de aire estático, obteniéndose valores muy similares en presencia y ausencia de la bolsa de plástico. Además, estos resultados mostraron nuevamente que el coeficiente de variación entre pocillos, aun siendo mucho menor que en la placa de 96 pocillos, continuaba superando el 20% y por tanto, siendo inaceptable cuando se hacía uso de la estufa de aire forzado, por lo que ésta quedó descartada definitivamente. Por el contrario, los coeficientes de variación cuando se utilizó la estufa de aire estático fueron inferiores al 20% por lo que éste fue el método que se decidió emplear en las siguientes fases del estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En resumen, a pesar de las dificultades ocasionadas por el empleo de medios de cultivo líquidos y tiempos de incubación tan prolongados, habíamos logrado formar biopelículas y cuantificarlas de forma reproducible, por lo que a partir de este momento, podíamos iniciar el segundo de los objetivos planteados encaminado a eliminar dichas biopelículas mediante la utilización de antimicrobianos naturales. La metodología para la formación de biopelículas debía reunir las siguientes condiciones: placa de 24 pocillos (2 mL/pocillo), tiempo de incubación de 24 horas, en estufa de aire estático a 37 °C.

5.2. Eliminación de biopelículas mediante la acción de antimicrobianos de origen natural.

Tras alcanzar el primer objetivo de este Trabajo Fin de Máster, se procedió a la evaluación la eficacia de 3 compuestos individuales de aceites esenciales que poseen propiedades antimicrobianas, (carvacrol, citral y óxido de limoneno) con el fin de eliminar las biopelículas de *E. coli* MG1655.

En primer lugar, antes de iniciar los estudios encaminados a destruir las biopelículas, fue preciso determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) de cada agente antimicrobiano para partir de un valor de referencia equivalente para cada uno. Una vez determinado, se procedió a realizar los estudios de destrucción de biopelículas mediante el empleo de concentraciones bactericidas equivalentes a 5 y 10xMIC. Las mínimas concentraciones inhibitorias para cada antimicrobiano en *E. coli* MG1655 se muestran en la Tabla 5. Estos resultados son similares a los previamente descritos por Somolinos y col. (2010) y Siroli y col. (2015).

Tabla 5. Mínima concentración inhibitoria (MIC) de 3 antimicrobianos sobre *E. coli* MG1655.

ANTIMICROBIANOS	MIC (ppm)
CARVACROL	200
CITRAL	1000
ÓXIDO DE LIMONENO	700

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras obtenerse la mínima concentración inhibitoria de cada antimicrobiano, se procedió a evaluar su eficacia para destruir la biopelícula formada por *E. coli* MG1655. Dada la influencia del pH del medio de tratamiento en la eficacia de los aceites esenciales y sus principales constituyentes (Burt, 2004; Ait-Ouazzou y col., 2011), la eliminación de las biopelículas se ensayó a pH neutro (pH 7,0) y pH ácido (pH 4,0). Además, con objeto de mejorar la precisión de nuestros resultados, en esta segunda fase del estudio se sustituyó la técnica de cristal violeta por la cuantificación de las biopelículas mediante la técnica de recuento en placa, tal y como se describe en el apartado 4.2.2.b.

Los resultados de la cuantificación de la biopelícula formada (según el protocolo descrito en el apartado 5.1.3) y posteriormente eliminada (según el protocolo descrito en el apartado 4.2.2) por cada uno de los agentes antimicrobianos, se muestran en las siguientes gráficas.

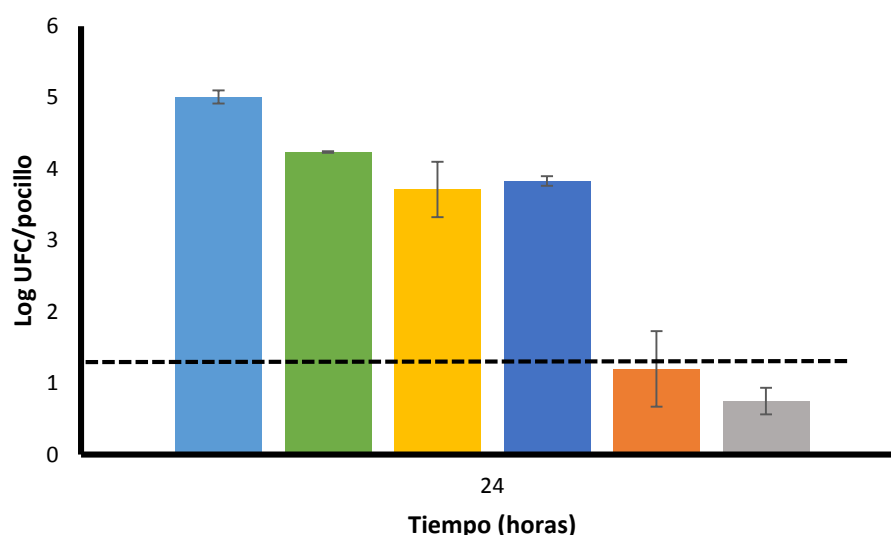


Figura 6. Destrucción de la biopelícula de *E. coli* MG1655 con carvacrol 10xMIC: (●) Biopelícula control; (●) Biopelícula tratada con agua; (●) Biopelícula tratada con tampón McIlvaine pH 7,0; (●) Biopelícula tratada con tampón McIlvaine pH 4,0; (●) Biopelícula tratada con carvacrol 10xMIC (pH 7,0); (●) Biopelícula tratada con carvacrol 10xMIC (pH 4,0).

Como se observa en la Figura 6, los experimentos de eliminación de biopelículas se iniciaron sobre una biopelícula formada tras 24 horas de incubación en una estufa de aire estático a 37 °C con una concentración celular de 10^5 UFC/pocillo. Sin embargo, tras la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

realización de los primeros experimentos se observó que la biopelícula formada por *E. coli* MG1655 era extremadamente lábil. Esa labilidad era tal que la inclusión de una segunda etapa de lavado del pocillo, requerida en los ensayos con antimicrobianos, causaba daños visibles en las biopelículas, lo que suponía la pérdida de gran parte de la población microbiana que formaba las biopelículas. De hecho, como se muestra en la Figura 6, el tratamiento de las biopelículas con agua o tampón pH 7,0 o pH 4,0 causaba una reducción en torno al 90% de la población microbiana. No obstante, y a pesar de la labilidad observada, la biopelícula seguía estando constituida por células viables que podrían ser fuente de contaminación desde un punto de vista práctico, por lo que seguía siendo igualmente importante lograr un método efectivo para causar el mayor grado de destrucción posible.

La Figura 6 muestra que la adición de una concentración de carvacrol de 10xMIC durante 60 minutos, causó la destrucción de más de 3 ciclos logarítmicos de microorganismos presentes en la biopelícula, situando los recuentos de supervivientes en el límite de detección (línea punteada) de la técnica de recuento en placa empleada.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con los 3 antimicrobianos y a las 2 concentraciones ensayadas, en pH 7,0 y 4,0.

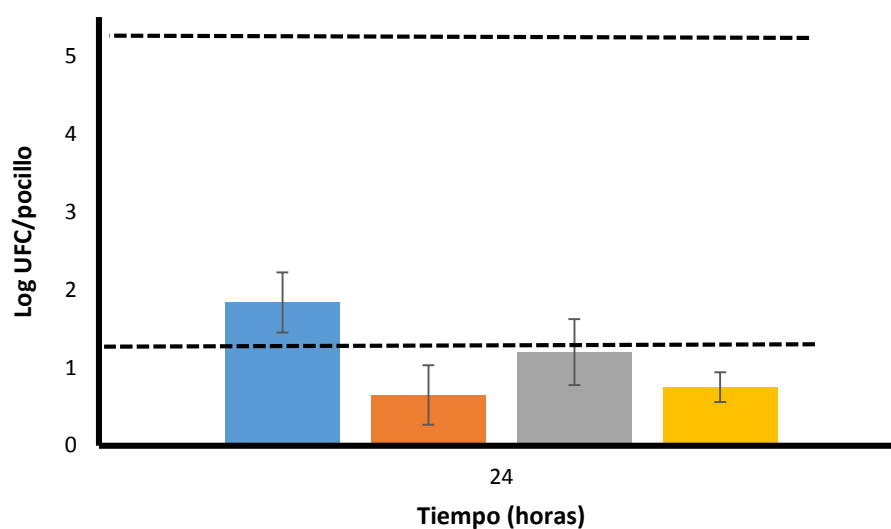


Figura 7 (A). Destrucción de la biopelícula de *E. coli* MG1655 mediante la aplicación de carvacrol: (●) Carvacrol 5xMIC (pH 7,0); (●) Carvacrol 5xMIC (pH 4,0); (●) Carvacrol 10xMIC (pH 7,0); (●) Carvacrol 10xMIC (pH 4,0).

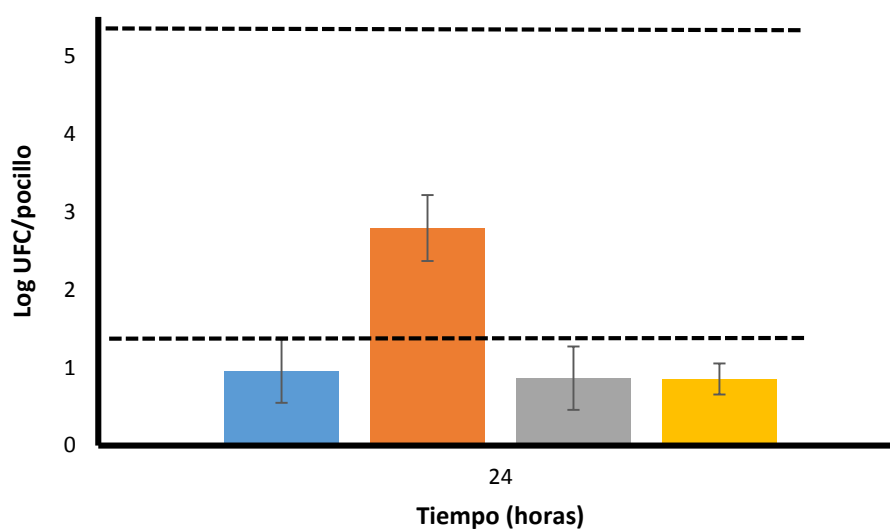


Figura 7 (B). Destrucción de la biopelícula de *E. coli* MG1655 mediante la aplicación de citral: (●) Citral 5xMIC (pH 7,0); (●) Citral 5xMIC (pH 4,0); (●) Citral 10xMIC (pH 7,0); (●) Citral 10xMIC (pH 4,0).

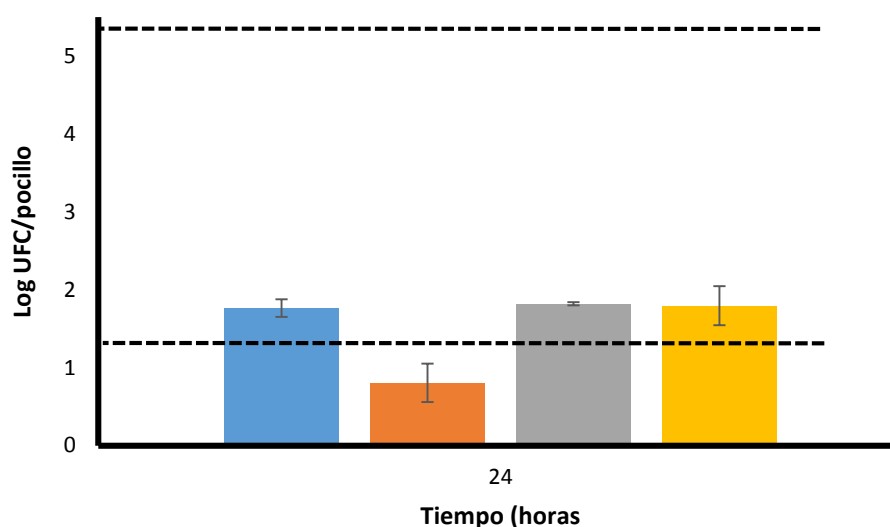


Figura 7 (C). Destrucción de la biopelícula de *E. coli* MG1655 mediante la aplicación de óxido de limoneno: (●) Óxido de limoneno 5xMIC (pH 7,0); (●) Óxido de limoneno 5xMIC (pH 4,0); (●) Óxido de limoneno 10xMIC (pH 7,0); (●) Óxido de limoneno 10xMIC (pH 4,0).

En la Figura 7 se muestran los principales resultados obtenidos en la segunda fase del estudio en cuanto a la destrucción de la biopelícula formada por *E. coli* MG1655 durante la primera fase. En las gráficas se muestran los recuentos de supervivientes tras la aplicación de cada uno de los 3 antimicrobianos (carvacrol, citral y óxido de limoneno) a 2 concentraciones (5 y 10xMIC) en un medio de tratamiento a pH 7,0 y 4,0.

Como se observa en la Figura 7, el pH del medio de tratamiento fue un factor decisivo en la eliminación de las biopelículas en función del antimicrobiano empleado. Si bien la eficacia del carvacrol y del óxido de limoneno aumentó al reducir el pH de 7,0 a 4,0 –ese efecto se puede observar cuando se ensayó la concentración de antimicrobiano más baja (5xMIC)–, en el caso del citral el efecto fue el contrario, mostrándose más eficaz a pH neutro. La mayor eficacia del citral sobre *E. coli* en medios de pH neutro ya fue observada y discutida en un estudio previo realizado sobre células planctónicas (Somolinos y col., 2010). Este estudio viene a confirmar que este efecto poco común en los antimicrobianos también sucedería sobre biopelículas de *E. coli*.

Teniendo en cuenta el pH de máxima sensibilidad de *E. coli* a cada antimicrobiano (carvacrol y óxido de limoneno: pH 4,0; citral: pH 7,0), la utilización de la mínima concentración de antimicrobiano ensayada (5xMIC) permitió reducir el número de células

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

viabiles en las biopelículas por debajo del límite de detección. Sin embargo, al pH de máxima resistencia (carvacrol y óxido de limoneno: pH 7,0; citral: pH 4,0), la destrucción de la biopelícula solo se logró cuando se duplicó la concentración (10xMIC), con excepción del óxido de limoneno que a pH 7,0 no logró la destrucción de la biopelícula incluso a esa mayor concentración.

Así, la combinación de moléculas de mayor efectividad a pHs neutros (citral), con moléculas de mayor efectividad a pHs ácidos (en especial carvacrol), podrían combatir la presencia de biopelículas de *E. coli* en medios de distinto pH.

Con este trabajo se inicia una nueva línea de investigación que en un futuro próximo deberá abordar como siguientes retos:

- Evaluar la eficacia de estos compuestos sobre otras especies microbianas formadoras de biopelículas, incluyendo bacterias Gram-positivas, patógenos y alterantes de los alimentos.
- Profundizar mediante el uso de herramientas moleculares en los mecanismos de formación y resistencia de las células que forman parte de las biopelículas.
- Estudiar la eficacia de estos antimicrobianos naturales en combinación con calor, a temperaturas habituales de lavado en caliente de equipamiento.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

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

- Se ha logrado poner a punto la metodología para la formación *in vitro* de una biopelícula de *Escherichia coli* MG1655 de forma reproducible, homogénea y obteniéndose una densidad microbiana adecuada para la realización de estudios de destrucción de biopelículas.
- La formación de la biopelícula requiere la incubación de los cultivos en TSB en placas de 24 pocillos (2 mL/pocillo) en estufa de aire estático durante 24 horas a 37 °C.
- Debido a la deshidratación que tiene lugar durante incubaciones prolongadas requeridas para la formación de biopelículas, no se recomienda la utilización de placas de 96 pocillos, debido al reducido volumen de medio de cultivo. El empleo de estas placas ocasiona una gran heterogeneidad entre las biopelículas formadas en los pocillos de la parte central y de la periferia.
- Los 3 antimicrobianos ensayados (carvacrol, citral y óxido de limoneno) se han mostrado efectivos como agentes antimicrobianos contra la biopelícula formada por *E. coli* MG1655, en función del pH y de la concentración de antimicrobiano.
- Mientras que la eficacia como antimicrobiano del carvacrol y del óxido de limoneno frente a las biopelículas se intensifica a pH 4,0, la del citral es mayor a pH 7,0. Al pH de máxima eficacia, los 3 antimicrobianos han logrado reducir en más de 3 ciclos logarítmicos la concentración de microorganismos en las biopelículas, logrando así su práctica destrucción.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN, 2010. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a las biopelículas y su repercusión en la seguridad alimentaria.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., 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), 320-329.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 55-64.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, 20-26.
- Berner, P.J., Fillery, S., McQuillan, A.J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (3), 254-262.
- Burt, S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Burt, S.A., Ojo-Fakunle, V.T.A., Woertman, J., Veldhuizen, E.J.A. (2014). The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. *PLoS ONE* 9(4): e93414. doi:10.1371/journal.pone.0093414
- Casal, A.M.O. (2004). Quorum sensing: el lenguaje de las bacterias. Editorial Acirbia. 1º ed, 1º imp.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
- Cloete, T.E., Jacobs, L., Brözel, V.S. (1998). The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation*, 9 (1), 23-37.
- Condón, S., Palop, S., Raso, J., Sala, F.J. (1996). Influence of the incubation temperatura after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*. 22(2), 149-152.

- Davey, M. E., O'Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 847-867.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I., Lejeune, p. (1999). Involvement of Cpx signal transduction pathway of *E.coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 169-175.
- Edstrom (2003). Biofilms. The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems, Second Edition by Paula H. Dreeszen.
- Espina, L., Pagán, R., López, D., García-Gonzalo, D. (2015). Individual constituents from essential oils inhibit biofilm mass production by multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 20, 11357-11372.
- Ferreira, C., Pereira, A. M., Melo, L. F. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, 845-854.
- Fuster i Valls, N. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas.
- García-Gonzalo, D., Pagán, R. (2015). Influence of Environmental Factors on Bacterial Biofilm Formation in the Food Industry: A Review. *Journal of Postdoctoral Research*, 3 (6), 3-13.
- Gómez-Sánchez, A. I., López-Malo, A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3-1, 33-45.
- González, F.R. (2005). Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes in situ de productos limpiadores comerciales.
- Kadam, S.R., den Besten, H.M., van der Veen, S., Zwietering, M.H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 259-264.

- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Kude, T., Yano, T., Kuda, M.T. (2008). Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT- Food Science and Technology*, 41 (6), 988-993.
- Lasa, I., del Pozo, J.L., Penadés, J.R., Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anuales del. Sistema. Sanitario de. Navarra*, 28 (2), 163-175.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 999–1007.
- Midelet, G., Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 262–270.
- Nilsson, R. E., Ross, T., Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14-24.
- O'Toole, G. A., Kaplan, H. B. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 49-79.
- OMS. (2015). World health day 2015. Food Safety.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M. (2008). The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 1070-1075.
- Sauer, K., Rickard, A. H., Davies, D. G. (2002). Biofilms and biocomplexity. *American Society for Microbiology*, 2, 347-353.
- Serra, P.G. (2003). Estudio de biofilms: formación y consecuencia. Disponible en: <http://magno.uab.es/epsi/alimentaria/biofilm.pdf> [acceso: 13-10-2009].
- Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 407-413.
- Simões, M., Simões, L.C., Machado, I., Pereira, M.O., Vieira, M.J. (2006). Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts*, 84 (4), 338-345.

- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43 (4), 573-583.
- Siroli, L., Patrignani, F., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015). Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Food Chemistry*, 182, 185-192.
- Somolinos, M., García, D., Condón, S., Mackey, B., Pagán, R. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1928-1939.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- Szczepanski, S., Lipski, A. (2014). Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, 36, 224-229.
- Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, 33, 273-280.