



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

**Efectos combinados del carvacrol y citral
en la eliminación de biopelículas**

**Combined effects of carvacrol and citral in
the elimination of biofilms**

Autor/es

Patricia Alfonso Grao

Director/es

Rafael Pagán Tomás

Diego García Gonzalo

Facultad de Veterinaria

2016



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

**Efectos combinados del carvacrol y citral
en la eliminación de biopelículas**

**Combined effects of carvacrol and citral in
the elimination of biofilms**

Autor/es

Patricia Alfonso Grao

Director/es

Rafael Pagán Tomás

Diego García Gonzalo

Facultad de Veterinaria

2016

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que han ayudado a la realización de este Trabajo Fin de Máster, en especial a Laura Espina, por su dedicación, apoyo y por todo lo que me ha enseñado.

Gracias también 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.

DATOS PERSONALES

Apellidos: ALFONSO GRAO

Nombre: PATRICIA

DNI: 7322125-L

Dirección: Gran Vía nº38, 5 Derecha

C.P.: 50005

Provincia: Zaragoza

Ciudad: Zaragoza

Teléfono: 686983632

Email: 651648@celes.unizar.es

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	8
2.1 Introducción a las biopelículas	10
2.2 Etapas del proceso de formación de las biopelículas.....	12
2.3 Presencia de biopelículas en la industria alimentaria	14
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Material y reactivos	20
4.2 Preparación de las biopelículas	21
4.3 Recuento del número de microorganismos presentes en las biopelículas	22
4.4 Tratamiento de destrucción de las biopelículas con carvacrol y citral....	22
4.5 Tratamiento con carvacrol y citral de las células sésiles	23
4.6 Análisis estadístico de datos	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1 Eliminación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e y <i>E. coli</i> MG1655 mediante la acción de antimicrobianos de origen natural en función de las condiciones de tratamiento.....	26
5.2 Aproximación al estudio de los mecanismos de resistencia de las biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> EGD-e y <i>E. coli</i> MG1655	33
6. CONCLUSIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

1. RESUMEN

Las biopelículas, más conocidas por el término inglés biofilms, son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. La estructura de estas comunidades microbianas incrementa la resistencia a los desinfectantes y antimicrobianos, lo que les convierte en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

Las biopelículas son un problema en la industria alimentaria, ya que, además de causar el deterioro de la maquinaria, en muchas ocasiones son responsables de la contaminación de los alimentos destinados al consumo humano, pudiendo suponer un riesgo para la salud pública.

En los últimos años, se ha demostrado la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas y medicinales, y se ha propuesto su uso como alternativa natural al empleo de compuestos químicos desinfectantes en la industria alimentaria.

De tal forma, el objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia del carvacrol y el citral (constituyentes habituales de los aceites esenciales), empleados por separado o en combinación, como agentes de destrucción de las biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* EGD-e y *Escherichia coli* MG1655. Así, se pretende determinar si estos compuestos empleados simultáneamente actúan de modo sinérgico en función de las condiciones de tratamiento, tales como la temperatura y el pH del medio de tratamiento.

Para llevar a cabo la formación de la biopelícula se requirió la incubación de los cultivos en placas de 24 pocillos (con 2 mL de TSB por pocillo) en estufas de aire estático, durante 72 horas a 37°C o 45°C.

Los 2 antimicrobianos ensayados (carvacrol y citral) fueron efectivos frente a las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli*; en ambos casos, el efecto antimicrobiano fue mayor al aumentar la concentración, y su aplicación simultánea mostró cierto sinergismo a 37°C.

El aumento de la temperatura de tratamiento hasta 45°C permitió aumentar la eficacia de los tratamientos realizados. Tratamientos a 45°C durante 60 min con 1000 ppm de carvacrol o citral lograron reducir la población de células viables de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e o *E. coli* MG1655 en más de 5 ciclos logarítmicos. Estos resultados apoyan la posibilidad de utilizar compuestos presentes en aceites esenciales como desinfectantes o coadyuvantes con el objetivo de controlar la diseminación de células infectantes provenientes de biopelículas en las industrias agroalimentarias.

Por último, el estudio de la resistencia de las células sésiles disgregadas permitió comprobar su mayor resistencia frente a las células plantónicas, lo que confirma el papel protector de la matriz de EPS y la propia agregación celular en la resistencia de las biopelículas frente a la acción de compuestos antimicrobianos.

ABSTRACT

Biofilms are microbial organizations composed of microorganisms that adhere to the surfaces by secreting an exopolymer. The structure of these microbial communities increases resistance to disinfectants and antimicrobials, which makes them difficult to eradicate from environments where they established.

Biofilms are a problem in the food industry, since they cause the deterioration of machinery and, in several occasions, are responsible for the contamination of food alimed for human consumption, which may pose a risk to public health.

In recent years, it has been demonstrated the efficacy of antimicrobial of the essential oils obtained from aromatic and medicinal plants, and has been proposed as a natural alternative to the use of disinfectants with chemical compounds in the food industry.

Therefore, the purpose of this study is to evaluate the effectiveness of carvacrol and citral (common constituents of essential oils), used separately or in combination, as agents of destruction of Biofilms formed by *L. monocytogenes* EGD-e and *E. coli* MG1655. This is intended to determine whether these compounds used simultaneously act synergistically according to the treatment conditions, such as temperature and pH of the treatment medium.

To implement the creation of the Biofilm, crop incubation in plates was required in 24 well plates (TSB with 2 mL per well) in static air stove, during 72 hours at 37°C or 45°C.

The 2 antimicrobials tested (carvacrol and citral) were effective against biofilms of *L. monocytogenes* EGD-e and *E. coli*, in both cases, the antimicrobial effect was higher as the concentration increased, and simultaneous application showed some synergism at 37°C.

A slight increase of the temperature to 45 ° C allowed more effective treatments performed. Treatments at 45 ° C for 60 min with 1000 ppm carvacrol and citral were able to reduce the population of viable cells of *L. monocytogenes* biofilms EGD -e or *E. coli* MG1655 by more than 5 log cycles. These results support the possibility of using

compounds present in essential oils as disinfectants or adjuvants in order to control the spread of infectious cells from biofilms in food processing industries.

Finally, the study of the resistance of disrupted sessile cells allowed check their greater resistance to planktonic cells , confirming the protective role of matrix EPS and cell aggregation in the resistance of biofilms itself against the action antimicrobial compounds.

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) afirma que son numerosos los factores y situaciones que pueden contribuir a la pérdida 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).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), «la inocuidad de los alimentos es una cuestión prioritaria para los consumidores, productores y gobiernos» y señala que «invertir en salubridad de los alimentos significa invertir en la próxima generación» (OMS, 1999).

La OMS insta, pues, a reforzar la seguridad alimentaria «desde el principio hasta el final de la cadena alimentaria» y a dar una respuesta integrada y global para asegurar la inocuidad de los alimentos.

La inocuidad, según la Real Academia de la Lengua Española, se define como el carácter de ser inocuo, es decir que no cause daño, aunque para algunos autores (Martínez et al., 2005) podría ser evaluada en términos de un aceptable nivel de riesgo. Así mismo, cada persona ha de tener el derecho a acceder a alimentos nutricionales adecuados e inocuos, es decir, con garantía de que los mismos no le causen daño a la salud cuando se preparen y/o se consuman de acuerdo con el uso al que se destinen. De este modo, la obtención y garantía de la inocuidad es y debe ser un objetivo no negociable.

A pesar de que en los países industrializados, gracias a la aplicación rigurosa de los procesos tecnológicos más adecuados y altos estándares de higiene, las enfermedades vehiculadas por alimentos han disminuido drásticamente, se estima que un 25% (OMS, 2015) de la población sufre, al menos, un episodio de enfermedad de transmisión alimentaria anualmente. En este sentido, la globalización de la distribución de alimentos significa también una globalización de los problemas de salud pública.

INTRODUCCIÓN

Entre los factores que contribuyen a los posibles riesgos de los alimentos se incluyen las prácticas agrícolas inadecuadas, la falta de higiene en todas las fases de la cadena alimentaria, la ausencia de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos, la utilización inadecuada de productos químicos, la contaminación de las materias primas, los ingredientes y el agua, el almacenamiento inadecuado, etc. (FAO, 2003).

Las infecciones e intoxicaciones transmitidas por los alimentos figuran en un lugar destacado entre las nuevas enfermedades e infecciones descubiertas en las últimas décadas; comprenden en particular la campilobacteriosis, las infecciones por *Cyclosporidium*, *Cyclospora*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (OMS, 1999).

El género *Listeria* agrupa bastones Gram positivos, no esporulados, aerobios-anaerobios facultativos. Son capaces de desarrollarse entre 4 y 45°C; es decir, pueden crecer a temperatura de refrigeración. Son psicrótrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa. Pueden llegar a tolerar concentraciones elevadas (10%) de cloruro de sodio y son móviles a 25°C pero no a 35°C (Michanie, 2004).

L. monocytogenes es un patógeno humano que se transmite a través de los alimentos y que causa infecciones graves, con una alta tasa de mortalidad. A pesar de la ubicuidad del microorganismo, la tasa real de la enfermedad es bastante baja y se asocia casi siempre a condiciones predisponentes. Tradicionalmente se considera que los aislamientos de alimentos y del ambiente tienen la misma capacidad patogénica que los aislamientos de origen clínico (López et al., 2010).

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente.

E. coli es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la flora intestinal; y es uno de los organismos patógenos más relevantes en el hombre, ya que incluye cepas patógenas que producen tanto infecciones gastrointestinales como de otros sistemas (urinario, sanguíneo, nervioso).

INTRODUCCIÓN

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 (Dolan, 2002). A estas estructuras biológicas se las denomina biopelículas (biofilms en inglés). Hoy en día se sabe que las biopelículas no son una rareza, sino 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.

En la actualidad, el primer plano que ocupaban las bacterias patógenas con mecanismos específicos de patogenicidad, ha sido usurpado por bacterias ubicuas, capaces de producir infecciones de tipo crónico, y capaces de formar biopelículas, entre las que se encuentran principalmente las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (Lasa, 2004).

2.1 Introducción a las biopelículas

La capacidad de formar biopelículas es un atributo universal de las bacterias. Las biopelículas son comunidades multicelulares, que se mantienen unidas por una matriz de exopolisacáridos de producción propia. Todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas bajo condiciones ambientales adecuadas (Lasa et al., 2005). Los mecanismos que las diferentes bacterias emplean para formar biopelículas varían dependiendo de las condiciones ambientales, así como de los atributos de las cepas específicas (López et al., 2010). En este sentido, los mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas también varían entre las diferentes especies, e incluso entre las diferentes cepas de la misma especie. Sin embargo, algunas características son comunes y se reconocen como atributos generales de la formación de biopelículas. Por ejemplo, todas las biopelículas contienen una matriz extracelular que mantiene las células juntas. Esta matriz está muy hidratada debido a que incorpora grandes cantidades de agua dentro de su estructura, llegando este elemento a representar

INTRODUCCIÓN

hasta el 97% de la biopelícula. Además de agua la matriz se compone de exopolisacáridos (EPS), siendo éste el componente fundamental, producido por los propios microorganismos integrantes. Junto a los EPS se encuentran otros componentes tales como proteínas o DNA (Branda et al., 2005). La naturaleza de la matriz de EPS varía en gran medida dependiendo de las condiciones de crecimiento, medio y sustratos (Nazar., 2007).

Las biopelículas se forman de manera espontánea en presencia de humedad y son capaces de sobrevivir con mínimas trazas de nutrientes. Las biopelículas llevan a cabo la adaptación en un medio adverso mientras cambian, lo que se basa en la activación de diversos grupos de genes (Serra, 2003).

Los factores que determinan en mayor medida la formación y desarrollo de una biopelícula son, entre otros, (Fuster i Valls., 2006; Srey et al., 2013; García-Gonzalo y Pagán., 2015):

- a) Propiedades de la superficie de contacto
- b) Tiempo de contacto
- c) Características de la superficie bacteriana
- d) Disponibilidad de nutrientes.
- e) Composición de la comunidad bacteriana
- f) Disponibilidad de agua
- g) Temperatura
- h) Concentración de oxígeno
- i) Composición de la matriz alimentaria
- j) Cepa microbiana
- k) pH del medio

2.2 Etapas del proceso de formación de las biopelículas

Vale la pena recordar que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos formas o estados:

- Bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en el fluido,
- Bacterias sésiles (como es el caso de las biopelículas), creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas.

La formación de una biopelícula no es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco fases: fase de unión inicial, fase irreversible, fase de desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula, fase de maduración y fase de dispersión de las células.

Las biopelículas bacterianas empiezan a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie (Figura 1). En esta etapa inicial de formación de la biopelícula se produce la adherencia sobre la superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura, pH, factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental y las proteínas. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biopelículas. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie en esta primera etapa de adherencia primaria.

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, que une a las células entre sí y a estas con la superficie (Augustin y Ali-Vehmas., 2004). Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, las células comienzan a crecer y a dividirse sobre la superficie en una monocapa, y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia (Lasa et al., 2005), dando lugar al desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula.

INTRODUCCIÓN

En una etapa posterior, las bacterias cambian su comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura de la biopelícula madura. Comienza a secretar un EPS que constituye la matriz de la biopelícula formando unas estructuras entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del EPS es diferente en cada bacteria. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos EPS como componentes de la matriz del biopelículas (López et al., 2010).

Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación de la biopelícula. La liberación de las bacterias desde la biopelícula es el proceso que menos se conoce (Lasa et al., 2005) (Figura 1).

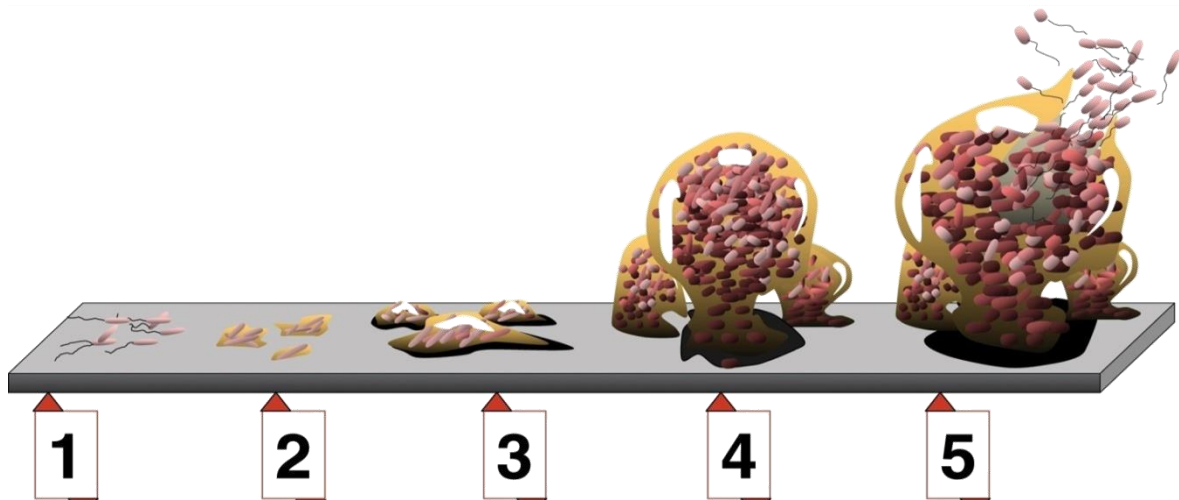


Figura 1. Etapas de formación de una biopelícula: 1-Unión inicial, 2-Unión irreversible, 3-Desarrollo de la arquitectura de la futura biopelícula, 4-Maduración, 5-Dispersión.

Por otra parte, cabe señalar que, además de la resistencia intrínseca propia de la biopelículas, las bacterias que conforma las biopelículas pueden sufrir mutaciones genéticas y/o adquirir elementos genéticos foráneos que le confieran mayor resistencia a las bacterias, como así se ha descrito en aquellos genes que codifican betalactamasas y enzimas modificantes de aminoglucósidos (Ramírez y Tolmasky., 2010).

2.3 Presencia de biopelículas en la industria alimentaria

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biopelículas en las superficies de conducciones, equipos y materiales. Los materiales que conforman las superficies de contacto con alimentos tienden a tener un gran efecto en el nivel de la unión y la formación de las biopelículas. Los materiales utilizados para las superficies de contacto con los alimentos son conocidos por ser de acero inoxidable, vidrio, caucho, poliuretano, teflón y madera en los países en desarrollo. Junto al propio material, el diseño higiénico, tal como la soldadura, juntas, esquinas, y el diseño del equipo podría también ser un factor determinante en la formación de biopelículas.

El tratamiento habitual de eliminación de las biopelículas comprende un tratamiento físico, que incorpora una limpieza mecánica y el uso de agua caliente, y un tratamiento químico mediante el empleo de biocidas, con objeto de inactivar los microorganismos presentes (Srey et al., 2013).

Los biocidas más empleados para la eliminación de biopelículas son (Edstrom., 2003):

- Biocidas oxidantes: cloro, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno.
- Biocidas no oxidantes: compuesto de amonio cuaternario, formaldehído, hipoclorito sódico.

Actualmente, las estrategias de control microbiano no son lo suficientemente eficientes para proporcionar una completa erradicación de microorganismos peligrosos sin afectar a las cualidades del producto. En las medidas de saneamiento se sabe que la eficacia de los desinfectantes en superficies, equipos, etc. puede reducir en más de 2 unidades logarítmicas las bacterias contaminantes. Se considera que, las células de las bacterias localizadas formando las biopelículas, se encuentran protegidas de los desinfectantes, lo que podría explicar la ineficacia de las soluciones desinfectantes (Srey et al., 2013).

La eficacia de los desinfectantes se ve limitada debido a la presencia de materia orgánica, a esto se le debe de sumar la influencia del pH, la temperatura, la concentración y el tiempo (Bremer et al., 2006; Kuda et al., 2008; Srey et al., 2013). Por otro lado, la toxicidad de algunos de estos desinfectantes desaconseja su uso en la industria alimentaria. Los residuos vertidos y emisiones que tienen lugar en las

INTRODUCCIÓN

industrias alimentarias en particular, y de cualquier otra actividad en general, son descargados al suelo, aire y agua. Todo ello genera importantes cambios en el medio, como el efecto invernadero, calentamiento global, contaminación atmosférica, de las aguas y del suelo y generación de residuos, que terminan repercutiendo en nuestra calidad de vida. De este modo, las industrias agroalimentarias deberán pues considerar la depuración de las aguas como una parte integrante del proceso productivo, con unos costes de inversión y mantenimiento, pues cada vez será mayor la presión legislativa es esa materia.

En la actualidad, como alternativa al uso de desinfectantes químicos tradicionales, se está estudiando la eficacia de antimicrobianos de origen natural. Ello responde además a la demanda de los consumidores por productos alimenticios más seguros, naturales y saludables.

Entre los antimicrobianos naturales más estudiados destacan los aceites esenciales (AEs) de especias y hierbas aromáticas, reconocidos algunos como sustancias GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros). Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los componentes de los AEs en la eliminación de las biopelículas.

Burt et al. (2014) estudiaron el efecto del carvacrol como componente principal del AE de orégano sobre la formación de biopelículas y su actividad en biopelículas ya existentes. El carvacrol, aplicado en concentraciones subletales, fue capaz de inhibir la formación de biopelículas de diversos microorganismos (*Chromobacterium*, *Salmonella* y *Staphylococcus*). Por el contrario, el carvacrol no mostró efecto frente a las biopelículas formadas previamente durante 16 horas, y tratadas posteriormente con concentraciones de 0-8 Mm durante 24 horas a 20°C.

Szczepanski y Lipski (2014) analizaron los efectos de inhibición del AE de tomillo, orégano y canela en concentraciones subletales sobre la formación de las biopelículas de tres cepas bacterianas (*Acinetobacter*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*). En este análisis, el AE de tomillo fue capaz de inhibir la formación de las biopelículas en concentraciones subletales, siendo el más eficaz.

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, Ait-Ouazzou et al. (2011) evaluaron la actividad antimicrobiana de los componentes hidrófobos generales de los AEs. En este estudio, se muestra que la mayoría de los compuestos ensayados, incluyendo algunos hidrocarburos, eran muy eficaces contra *L. Monocytogenes* y *E. coli*.

En resumen, la mayor parte de los autores muestran que las bacterias, cuando se encuentran formando biopelículas, son más resistentes frente a los agentes antimicrobianos que cuando se encuentran como células planctónicas. Por ello, se propone la utilización de nuevos antimicrobianos de origen natural actuando individualmente o en combinación, que sean eficaces y seguros, y además, económicos y respetuosos con el alimento y el medio ambiente, como alternativa a las estrategias convencionales de limpieza y desinfección para la eliminación de las biopelículas microbianas en la industria alimentaria. Además, este Trabajo Fin de Máster pretende abordar por primera vez en nuestro grupo de investigación el estudio de los mecanismos de resistencia de microorganismos formadores de biopelículas, lo que contribuirá al diseño y optimización de las condiciones de tratamiento.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Máster aborda el estudio in vitro de la eliminación de microorganismos de biopelículas formadas por los microorganismos de *E. coli* MG1655 y *L. monocytogenes* EGD-e para alcanzar los siguientes objetivos:

- Evaluar la eficacia del carvacrol y el citral, como agentes de destrucción de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655
 - en función de las condiciones de tratamiento, tales como la temperatura y el pH del medio de tratamiento, y
 - determinar si estos compuestos empleados simultáneamente actúan de modo sinérgico en función de las condiciones de tratamiento.
- Estudiar los mecanismos de resistencia de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, frente a estos agentes, mediante la resistencia de las células sésiles.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material y reactivos

Material

- Agitador vórtex.
- Asas de siembra.
- Centrífuga (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).
- Contador automático de colonias (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, Reino Unido).
- Eppendorf 1,5 mL.
- Estufa de aire estático (J.P. Selecta, Bilbao, España).
- Estufa de aire forzado (modelo 207, J.P. Selecta).
- Frascos de vidrio de 50, 100 y 250mL.
- GraphPad Software (Inc, San Diego, Estados Unidos).
- Micropipetas de 20, 100 y 1000 μ L.
- pH metro (modelo BASIC 20+, Crison, Barcelona, España).
- Pipetas graduadas estériles de 10 y 50mL.
- Placas de microtitulación de 24 pocillos (NunclonTM Delta, ICT S.L., Lardero, La Rioja, España).
- Placas de cultivo.
- Tubos de 1,5mL.
- Tubos de ensayo.
- Tubos falcon.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Ultrasonidos (Allendale-ultrasonics.co.uk, cavitek professional series, Hertfordsire, Reino Unido).

Reactivos

- Ácido cítrico 1-hidratado PA-ACS-ISO (C₆H₈O₇ H₂O) (Panreac, Barcelona, España).
- Agar tripticasa de soja (TSA) (Oxoid, Hampshire, Reino Unido).
- Agua de peptona tamponada (AES Laboratorie, Combourg, Reino Unido).
- Caldo tripticasa de soja (TSB) (Oxoid).
- Carvacrol $\geq 98\%$, FCC, FG (SigmaAldrich, San Luis, Estados Unidos).
- Citral (mezcla cis y trans) 95% (SigmaAldrich).
- Extracto de levadura (YE)(Oxoid).
- Fosfato disódico (Reag.Ph.Eur) PA-ACS (Na₂HPO₄)(Panreac).
- Tween20(SigmaAldrich).

4.2 Preparación de las biopelículas

Para llevar a cabo la formación de las biopelículas se emplearon dos cepas bacterianas diferentes *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655. En primer lugar, se realizó la preparación del precultivo microbiano; para ello, se inoculó una colonia, previamente aislada, en un tubo de ensayo con caldo de cultivo tripticasa de soja (TSB). Este tubo con TSB se dejó incubando en agitación a 37°C durante 12 horas. A continuación se inoculó, en una proporción 1:100, el precultivo en caldo de cultivo TSB, previamente preparado. Seguidamente, se añadió 2 mL del cultivo en una placa de microtitulación de 24 pocillos (Figura 2). La placa con el cultivo se incubó a 37°C durante 72 horas en una estufa de aire estático. Tras las 72 horas se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se procedió al lavado de la placa cuidadosamente con agua destilada, para eliminar los restos medio de cultivo.



Figura 2.Placa de 24 pocillos

4.3 Recuento del número de microorganismos presentes en las biopelículas

Una vez realizado el lavado, en cada pocillo de la placa se añadieron 1,5 ml de agua de peptona (0,1%) con Tween 20 (dilución 1:100), a los cuales se les aplicó ultrasonidos durante diez minutos para lograr la disgregación de la biopelícula formada en la placa. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona (0,1%) y se procedió a la siembra de 100 μ L en placas de cultivo por homogeneización en masa en medio de cultivo tripticasa de soja (TSA). Las placas sembradas con colonias de *L. monocytogenes* EGD-e se incubaron durante 48 horas a 35°C, mientras que las placas sembradas con colonias de *E. coli* MG1655 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 el contador automático de colonias.

4.4 Tratamiento de destrucción de las biopelículas con carvacrol y citral

Tras el lavado, para realizar el tratamiento con los diferentes compuestos individuales (CIs) (citral y carvacrol) de AEs en los pocillos con formación de biopelículas, se añadió a cada uno de los pocillos 2 mL de tampón McIlvaine a pH 4,0 y pH 7,0 con los CIs disueltos. Los CIs se aplicaron a una concentración de 500 ppm para evaluar su acción individual, la cantidad aplicada en el tratamiento fue seleccionada en base a estudios previos, de este modo se seleccionó una cantidad no muy elevada para comprobar la capacidad de inactivación frente a las biopelículas. Otra cantidad usada fue, 250 ppm (de cada CI) para evaluar el sinergismo entre ellos. Se dejó actuar al

MATERIAL Y MÉTODOS

antimicrobiano, en contacto con la biopelícula, durante 60 minutos a una temperatura de 37 y 45°C. Transcurrido este tiempo, se realizó el lavado de los pocillos como se describe en el apartado 4.2, para realizar el posterior recuento en placa con el fin de determinar la cantidad de microorganismos eliminados de la biopelícula (Figura 3).

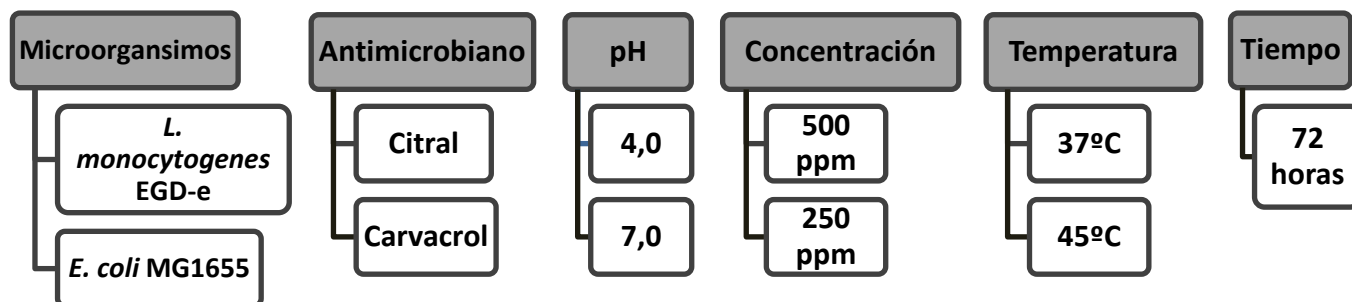


Figura 3. Esquema de las condiciones del tratamiento de destrucción de biopelículas ensayadas.

4.5 Tratamiento con carvacrol y citral de las células sésiles

Una vez lavados todos los pocillos de la placa como se describe en el apartado 4.2, se llevó a cabo el tratamiento con los CIs de los AEs de las células sésiles según se describe a continuación. Con la ayuda de un asa de siembra se desprendió la biopelícula del pocillo, y se procedió a su resuspensión mediante la adición de 1,5 mL de agua de peptona (0,1%) con Tween20 (dilución 1:100) en cada pocillo. Una vez separada la biopelícula de la superficie y disgregada, se traspasó el total del volumen de cada pocillo a tubos eppendorfs, los cuales se sometieron a sonicación durante 10 minutos con el fin de lograr la disgregación total de las células.

El siguiente paso, fue la centrifugación de los eppendorfs durante 10 minutos a 5000 rpm. Transcurridos 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se realizó la resuspensión del pellet añadiendo a cada uno de los eppendorfs 1,5 mL de tampón McIlvaine a pH 4 y pH 7, sin adición de CIs de Aes (control) y con los diferentes CIs (citral y carvacrol) disueltos. La figura 4 describe la matriz experimental ensayada. La duración del tratamiento fue de 60 minutos a una temperatura de 45°C. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones seriadas en agua de peptona (0.1%) y se sembraron 100 µL en placas de cultivo por homogeneización en masa en medio TSA. Las placas

MATERIAL Y MÉTODOS

sembradas con colonias de *L. monocytogenes* EGD-e se incubaron durante 48 horas a 35°C, mientras que las placas sembradas con colonias de *E. coli* MG1655 se incubaron durante 24 horas a 35°C.

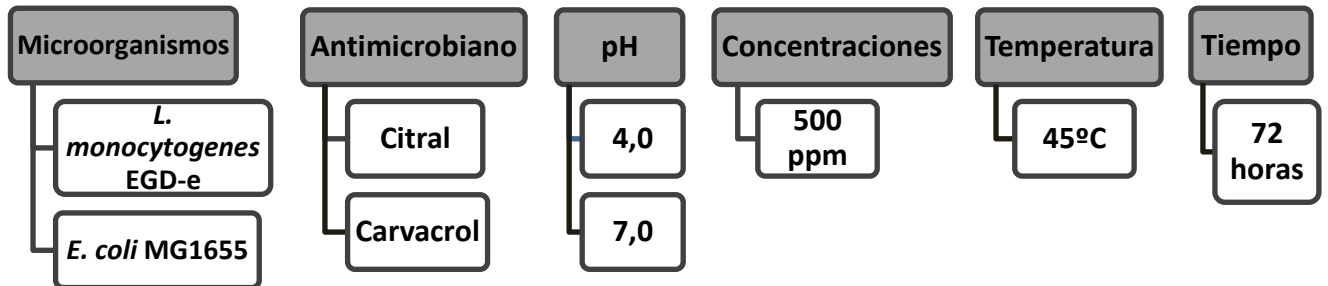


Figura 4. Esquema de las condiciones del tratamiento de destrucción de células sésiles ensayadas.

4.6 Análisis estadístico de datos

Los datos para la 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 (%), calculado mediante la siguiente ecuación:

$$CV (\%) = \frac{SD}{media} \times 100$$

Por otro lado, se empleó el t-test o análisis ANOVA para detectar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados, 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 Eliminación de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 mediante la acción de antimicrobianos de origen natural en función de las condiciones de tratamiento

5.1.1. Influencia del antimicrobiano y del pH del medio de tratamiento sobre la eliminación de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 y evaluación de la existencia de sinergismos entre ambos antimicrobianos

En primer lugar se evaluó la eficacia de 2 CIs que poseen propiedades antimicrobianas (carvacrol y citral) (Ait-Ouazzou et al., 2011) con objeto de eliminar las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655. Los parámetros de tratamiento empleados en la destrucción de estas biopelículas se establecieron en base a estudios previos, que utilizaron concentraciones de al menos 2000 ppm de cada antimicrobiano (Villamayor, 2015).

De esta manera, se decidió reducir la concentración de cada antimicrobiano a 500 ppm, con el fin de evaluar su eficacia para destruir ambas biopelículas mediante la técnica de recuento en placa. Dada la influencia del pH del medio de tratamiento en la eficacia antimicrobiana de los AEs y sus principales CIs (Burt, 2014; Ait-Ouazzou et al., 2011), la eliminación de las biopelículas se ensayó tanto a pH neutro (pH 7,0) como a pH ácido (pH 4,0).

La figura 5 muestra el efecto de la adición de 500 ppm de los antimicrobianos durante 60 minutos a una temperatura de 37°C sobre una biopelícula de *L. monocytogenes* EGD-e y otra de *E. coli* MG1655, formadas tras 72 horas de incubación en una estufa de aire estático a 37°C. En primer lugar, se determinó que la concentración celular inicial en las biopelículas era de: 10^7 UFC/pocillo en el caso de *L. monocytogenes* EGD-e y de 10^6 UFC/pocillo en el caso de *E. coli* MG1655, aproximadamente. A modo de control, se verificó que el tratamiento durante 60 minutos en ausencia de antimicrobianos, únicamente en presencia del tampón, eliminaba entre 1 y 2 ciclos logarítmicos de la población microbiana inicial, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tampón de pH 4,0 y el de pH 7,0. Esta reducción en las células viables pudo deberse en gran parte a cierta labilidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de las biopelículas y al “efecto lavado” (o de arrastre). A pesar de eliminar gran parte de la biopelícula inicial, esta seguía estando constituida por células viables que son fuente de posible contaminación desde un punto de vista práctico, por lo que seguía siendo igualmente importante lograr un método efectivo que permitiera lograr el mayor grado de destrucción posible.

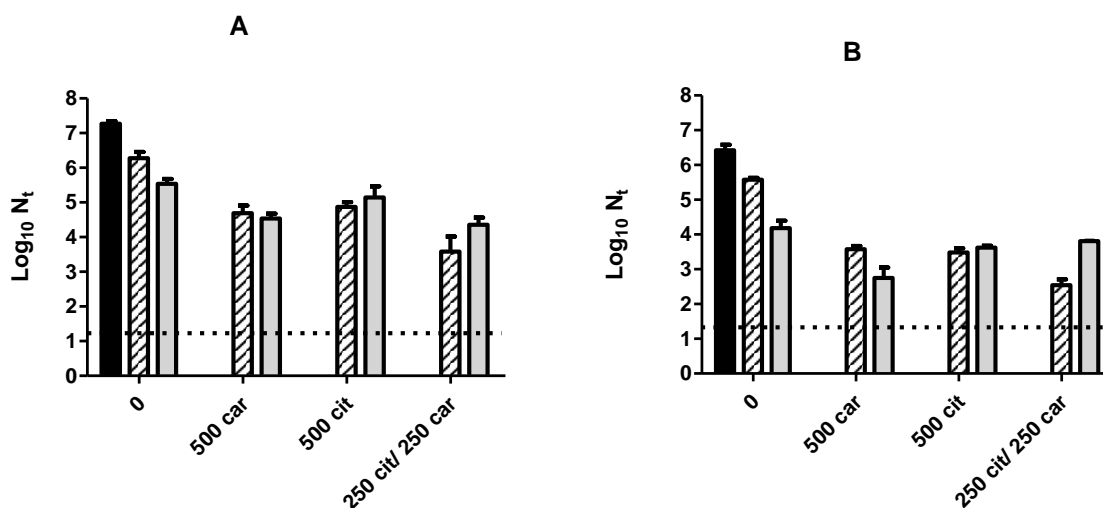


Figura 5. Recuentos microbianos (UFC/pocillo) de las biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) tras incubación a 37°C durante 60 min en McIlvaine pH 4,0 (barras rayadas) o pH 7,0 (barras grises) en ausencia de antimicrobianos (0), y en presencia de 500 ppm de carvacrol (500 car), 500 ppm de citral (500 cit) y de 250 ppm de carvacrol y 250 ppm de citral, aplicados simultáneamente (250 cit/250 car). La barra negra indica el recuento previo al tratamiento. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada.

En el caso de *L. monocytogenes* EGD-e, la aplicación de 500 ppm de carvacrol permitió reducir la población viable de la biopelícula en 1,5 ciclos logarítmicos (a pH 4,0) o 1 ciclo logarítmico (a pH 7,0) en comparación con el tratamiento en los tampones de respectivos pHs sin antimicrobiano (Figura 5A). Por otro lado, el tratamiento con citral con una concentración de 500 ppm permitió reducir la población de la biopelícula inicial de *L. monocytogenes* en aproximadamente 1 ciclo logarítmico (a pH 4,0) o medio ciclo logarítmico (a pH 7,0) en comparación con el tampón sin antimicrobiano. De este modo, en todos los casos se alcanzó una reducción de más de 2 ciclos logarítmicos con respecto a la biopelícula inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de *E. coli* MG1655, el antimicrobiano más efectivo en este estudio también fue el carvacrol, logrando reducir la población viable de las biopelículas en 2 ciclos logarítmicos (a pH 4,0) o 1,5 ciclos logarítmicos (a pH 7,0) en comparación con cada tampón sin antimicrobiano. El tratamiento con una concentración de 500 ppm de citral redujo 2 ciclos logarítmicos de la población a pH 4,0 y alrededor de medio ciclo logarítmico a pH 7,0. La mayor eficacia del carvacrol respecto al citral en ambas especies microbianas coincide con resultados anteriores obtenidos en células planctónicas expuestas a 200 ppm de uno u otro CI durante 10 minutos (Ait-Ouazzou et al., 2013).

Respecto a la influencia del pH, se observó que en ambos microorganismos y para ambos CIs la proporción de células inactivadas de las biopelículas fue mayor cuando el antimicrobiano se encontraba en un medio de tratamiento ácido que cuando estaba en un medio neutro. Además, al comparar la reducción de la población viable respecto a la biopelícula inicial, en el caso de *E. coli* MG1655 la acción de 500 ppm de carvacrol fue significativamente mayor a pH ácido en comparación con la obtenida a pH neutro ($p < 0,05$). Teniendo en cuenta la reducida concentración que se añadió de cada antimicrobiano, esta ligera mayor eficacia a pH ácido parece constatar la consideración previa de que el pH del medio de tratamiento es un factor decisivo sobre la eficacia de los antimicrobianos en la destrucción de biopelículas bacterianas (Saá., 2011; Fernández., 2015), aunque serían necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

Con el objetivo de evaluar una posible acción sinérgica entre el carvacrol y el citral y de este modo potenciar su efecto como antimicrobianos, se disminuyó la concentración de cada antimicrobiano (250 ppm) y ambos compuestos se aplicaron simultáneamente sobre las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e o de *E. coli* MG1655. Como se puede observar en la Figura 5A, se consiguió una mayor reducción de la biopelícula de *L. monocytogenes*, superior a 3 ciclos logarítmicos a pH 4,0, y a 2 ciclos logarítmicos a pH 7,0, en comparación con la aplicación de los tratamientos con 500 ppm de los CIs aplicados por separado, señalando la existencia de cierto sinergismo entre ambos CIs. En *E. coli* MG1655 (Figura 5B), a pH 4,0 se consiguió una reducción logarítmica con respecto a la biopelícula inicial de 4 ciclos logarítmicos, y una reducción de 2,5 ciclos a pH 7,0 con respecto la concentración inicial, observándose por tanto en *E. coli* la existencia de un pequeño efecto sinérgico

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

entre ambos compuestos solamente a pH 4,0. En cualquier caso, y en base a la experiencia previa del grupo de investigación no se consideró un efecto combinado relevante por la aplicación de ambos CIs, ya que se consiguió únicamente un ciclo más de inactivación en comparación con los tratamientos por separado.

Los datos obtenidos a 37°C muestran que el efecto antimicrobiano de la aplicación de 500 ppm de citral y carvacrol es escasa y no permite lograr la completa destrucción de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655, por lo que se decidió modificar las condiciones de tratamiento, incrementando la temperatura y la concentración de los antimicrobianos.

5.1.2 Influencia de la temperatura y la concentración del antimicrobiano en la eliminación de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655

Con el fin de potenciar el efecto obtenido con los diferentes antimicrobianos, se incrementó la temperatura de tratamiento hasta 45°C, temperatura no letal para *L. monocytogenes* y *E. coli* (datos no mostrados), tratando de emular condiciones más próximas a las que se puedan aplicar durante, por ejemplo, una etapa de lavado en caliente en la industria alimentaria. Al mismo tiempo, y con objeto de determinar el efecto de la concentración de los CIs, se evaluó la eficacia antimicrobiana de 500 y 1000 ppm de citral y carvacrol para cada una de las dos especies bacterianas seleccionadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

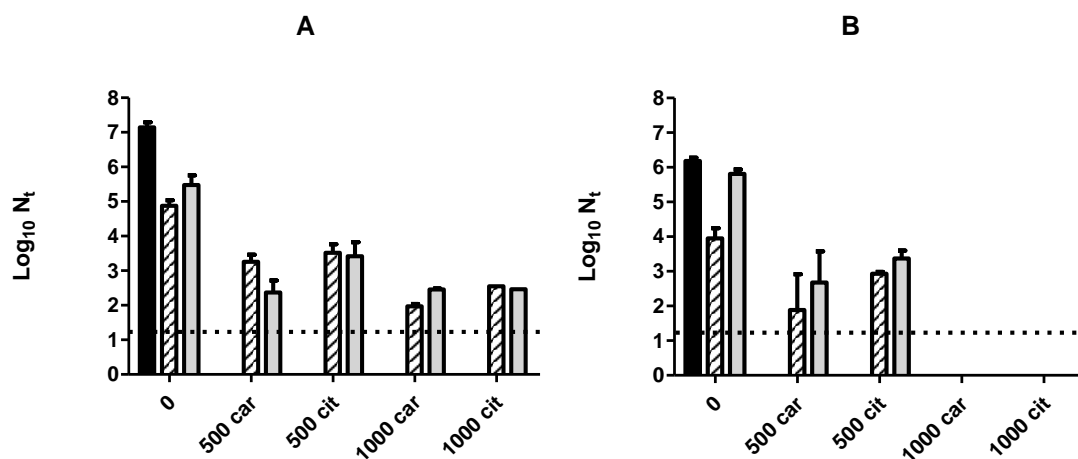


Figura 6. Recuentos microbianos (UFC/pocillo) de las biopelículas de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) tras su incubación 45°C durante 60 min en McIlvaine pH 4,0 (barras rayadas) o pH 7,0 (barras grises) en ausencia de antimicrobianos (0), y en presencia de 500 o 1000 ppm de carvacrol (500 car o 1000 car) y 500 o 1000 ppm de citral (500 cit o 1000 cit). La barra negra indica el recuento previo al tratamiento. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada.

Como se muestra en la Figura 6A, el tratamiento sobre *L. monocytogenes* durante 60 minutos en ausencia de antimicrobianos, únicamente en presencia del tampón a 45°C y pH 4,0, eliminó más de 2 ciclos logarítmicos de la población microbiana inicial, mientras que con el tampón a 45°C y pH 7,0 se eliminó más de 1 ciclo logarítmico de la población microbiana inicial. La comparación de estos resultados con los obtenidos a 37°C permite determinar que el efecto de lavado o arrastre a 45°C fue levemente superior. No obstante, a pesar de eliminar gran parte de la biopelícula inicial únicamente con el tampón, esta continuaba estando constituida por células viables que podrían ser fuente de contaminación, por lo que seguía siendo necesario determinar las condiciones de tratamiento que permitieran maximizar el grado de destrucción de las biopelículas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando las biopelículas se trataron con una concentración de 500 ppm de citral se observó una reducción logarítmica de 3,5 ciclos con respecto a la concentración inicial en ambos pHs. Al aumentar la concentración de citral a 1000 ppm, se observó una reducción de 5 ciclos logarítmicos con respecto a la población microbiana inicial.

Cuando el antimicrobiano empleado en la destrucción de las biopelículas de *L. monocytogenes* fue el carvacrol, a pH 4,0 su aplicación a 500 ppm produjo una reducción de 3,5 unidades logarítmicas con respecto a la población microbiana inicial, mientras que a pH 7,0 bajo las mismas condiciones se produjo una reducción de 4,5 unidades logarítmicas de esta población. En este caso se muestra que la inactivación a pH neutro es mayor que a pH ácido, pese a que en otros estudios se ha demostrado que la destrucción de biopelículas de *L. monocytogenes* a pHs ácidos se realiza de manera más efectiva que a pH neutros (Saá, 2011). Esto puede deberse a que la concentración de CI no es lo suficientemente elevada para observar estas diferencias.

El aumento de la temperatura de 37 a 45°C provocó una mayor efectividad de los CIs para conseguir la destrucción de las biopelículas de *L. monocytogenes* (Figuras 5A y 6A). A 37°C se consigue una máxima reducción de 2 ciclos logarítmicos; en cambio, cuando se aumenta la temperatura de tratamiento se produce como mínimo una reducción de 3,5 ciclos logarítmicos.

Cuando se aumentó la concentración de carvacrol hasta 1000 ppm a una temperatura de 45°C, la inactivación a pH ácido fue mayor que a pH neutro, a diferencia de lo observado cuando la concentración fue de 500 ppm. De este modo se consiguió reducir 5,5 ciclos logarítmicos con respecto a la población microbiana inicial a pH 4,0 (1000 ppm carvacrol), frente a los 4,5 ciclos logarítmicos que se logran reducir a pH 7,0.

Con respecto a las biopelículas de *E. coli*, como se observa en la figura 6B, la reducción que causa el tratamiento durante 60 minutos sobre *E. coli* MG1655 en ausencia de antimicrobianos, únicamente con el tampón a 45°C y pH 4,0 es de 2 unidades logarítmicas. Mientras que la reducción a pH 7,0 es mucho menor, ya que no alcanza apenas una reducción logarítmica. En este caso si comparamos los datos con los de 37°C (figura 5B y 6B), se observa que a pH ácido, la inactivación a 45 °C es 1 ciclo logarítmico mayor con respecto a la concentración microbiana inicial. Sin embargo a pH básico no se muestran diferencias relevantes entre ambas temperaturas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, cuando la biopelícula de *E. coli* MG1655 fue tratada con una concentración de 500 ppm de citral a pH 4,0 a 45°C, se observó una reducción logarítmica de 3 ciclos con respecto a la población microbiana inicial. Del mismo modo, cuando las biopelículas fueron tratadas con 500 ppm de citral a pH 7,0 a la misma temperatura, se produjo una reducción logarítmica de 2,5 ciclos sobre la población microbiana inicial. El presente estudio ha demostrado que cuando el tratamiento se realiza con citral, es más efectiva la destrucción de la biopelícula a pH ácido, tal y como se había evidenciado en células planctónicas Gram-negativas (Somolinos et al., 2010).

La comparación de los resultados del tratamiento con 500 ppm de citral sobre la biopelícula de *E. coli* a las diferentes temperaturas evidenció que la eficacia de este CI frente a la biopelícula es mucho mayor cuando se lleva a cabo un aumento de la temperatura de tratamiento, ya que se consigue 1 ciclo logarítmico adicional de reducción de la población inicial. Los datos obtenidos al aplicar una concentración de citral de 1000 ppm a 45°C muestran la práctica destrucción de la biopelícula, ya que se obtuvieron reducciones superiores al límite de detección tanto a pH neutro (7,0) como ácido (4,0).

El uso de carvacrol a 500 ppm como antimicrobiano para la destrucción de las biopelículas produjo más de 4 unidades logarítmicas de reducción microbiana con respecto la concentración inicial a pH 4,0, mientras que a pH 7,0 bajo las mismas condiciones se observó una reducción de 3 unidades logarítmicas con respecto a la inicial. Estudios previos evidenciaron resultados similares acerca del mayor efecto del carvacrol a pHs bajos sobre células planctónicas (Ait-Ouazzou et al., 2011).

El tratamiento con ambos CIs (500 ppm) a 45°C fue más efectivo que a 37°C probablemente debido a la menor resistencia de la matriz y la mayor solubilidad de los antimicrobianos, de modo que el aumento de la temperatura podría estar ligado a un aumento en la sensibilidad microbiana como consecuencia de una mayor fluidez de la bicapa lipídica que compone la membrana citoplasmática, y que determina un incremento en su permeabilidad a moléculas pequeñas (Núñez y D' Aquino, 2012), como es el caso de los constituyentes de aceites esenciales empleados en este estudio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A una concentración de 1000 ppm de carvacrol sobre *E. coli*, se lograron reducciones superiores a los 5 ciclos logarítmicos de la población inicial tanto a pH neutro (7,0) como ácido (4,0), al igual que ocurría en el citral. Si esto se compara con los datos de carvacrol 500 ppm la destrucción es mucho más efectiva ya que se aumenta el doble la concentración del CI.

5.2 Aproximación al estudio de los mecanismos de resistencia de las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e y *E. coli* MG1655 respecto a los mecanismos de resistencia de células planctónicas

Una de las características más distintivas de las biopelículas bacterianas es su mayor resistencia frente a la acción de sustancias antibióticas en comparación con poblaciones bacterianas de células libres planctónicas de similar densidad poblacional (Mah y O'Toole, 2001). Aunque cada sustancia antimicrobiana presenta su particular mecanismo de inactivación, en general se postulan dos mecanismos diferenciados para explicar esta disminución de sensibilidad en las biopelículas. Por una parte, se ha sugerido que durante el crecimiento de las biopelículas se induce un fenotipo específico en las subpoblaciones de nuevas células bacterianas como consecuencia de su entorno particular de crecimiento, caracterizado por un reducido acceso a nutrientes y una elevada densidad poblacional. Entre otras características, este fenotipo-biopelícula presentaría una mayor resistencia a la acción de antimicrobianos (Mah y O'Toole, 2001).

La segunda teoría que se maneja actualmente para explicar la mayor resistencia de las biopelículas a la inactivación por antimicrobianos se basa en la reducción o el enlentecimiento de la difusión de las sustancias antimicrobianas a través de las biopelículas (Mah y O'Toole, 2001). En este caso, la matriz extracelular de EPS presente en las biopelículas actuaría como una simple barrera física que impediría el acceso de los antimicrobianos a las células bacterianas.

En una aproximación al esclarecimiento sobre cuál de estas dos hipótesis es más probable en el caso de los dos CIs seleccionados, diseñamos un sencillo experimento en el cual las células sésiles de las biopelículas fueron mecánicamente disgregadas justo antes de someterse al tratamiento con antimicrobianos. De este

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

modo, aunque las células estarían fenotípicamente diferenciadas como células pertenecientes a biopelículas, no estarían rodeadas por la matriz extracelular protectora, por lo que la influencia de esta matriz sobre la resistencia de las células a los CIs podría ser fácilmente evaluada.

La Figura 7 muestra el efecto de la adición de una concentración de 500 ppm y 1000 ppm de los 2 antimicrobianos durante 60 minutos a una temperatura de 45°C sobre células sésiles disgregadas de las biopelículas (tras 72 horas de crecimiento) formadas por *L. monocytogenes* EGD-e o por *E. coli* MG1655. Por tanto, la comparación de los resultados de esta Figura con los de la Figura 6 permite la evaluación del efecto protector de la matriz extracelular sobre la acción antimicrobiana de los CIs.

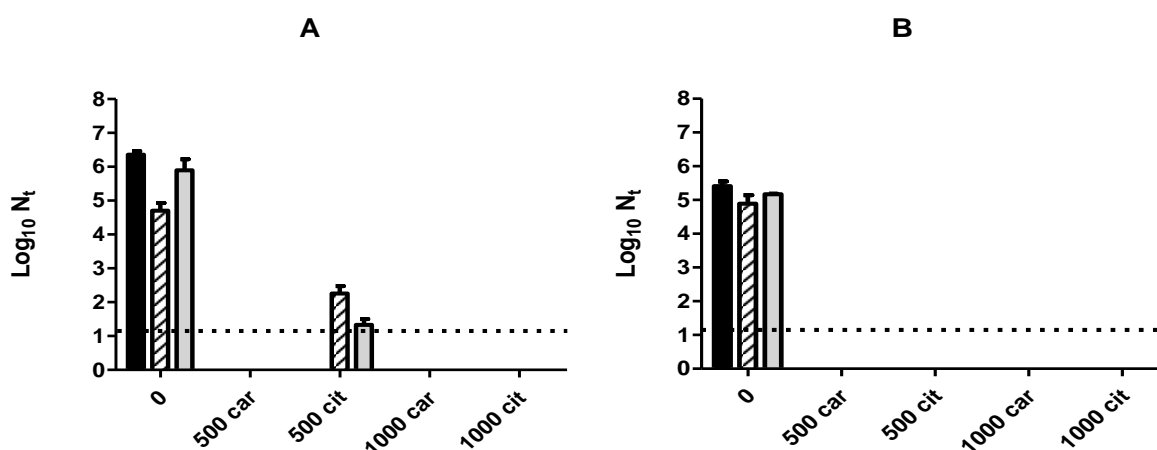


Figura 7. Recuentos (UFC/pocillo) de células sésiles de *Listeria monocytogenes* EGD-e (A) y *Escherichia coli* MG1655 (B) tras incubación a 45°C durante 60 min en McIlvaine pH 4,0 (barras rayadas) o pH 7,0 (barras grises) en ausencia de antimicrobianos (0), y en presencia de 500 o 1000 ppm de carvacrol (500 car o 1000 car) y 500 o 1000 ppm de citral (500 cit o 1000 cit). La barra negra indica el recuento antes del tratamiento. Se muestra la media y la desviación estándar (barras de error) de tres réplicas independientes. La línea de puntos indica el límite de detección de la técnica de recuento utilizada.

En primer lugar, se determinó la concentración inicial de células sésiles en la biopelícula disgregada: 10^6 UFC/pocillo en el caso de *L. monocytogenes* EGD-e y de 10^5 UFC/pocillo en el caso de *E. coli* MG1655. En este apartado, se mostró una concentración inicial menor que en el apartado anterior (Figura 6) en ambas especies

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

bacterianas, siendo esta concentración inicial de 1 ciclo logarítmico menos. Esta menor concentración celular pudo deberse a que se perdiera parte de la población bacteriana en el proceso de disgregación mecánica de las biopelículas. En cualquier caso, esta observación no se considera relevante ya que en los tratamientos control sin antimicrobianos a ambos pHs se obtuvieron niveles similares (o incluso mayores) de recuentos bacterianos a los obtenidos en el tratamiento de biopelículas sin disgregar.

Como se ha mencionado previamente, la comparación de los resultados obtenidos en las figuras 6 y 7 permite concluir en ambas especies bacterianas que la disgregación de las biopelículas conllevó una mayor actividad bactericida de los dos CIs evaluados a ambos pHs. El incremento en la inactivación al disgregar las células sésiles osciló entre 1 ciclo logarítmico de diferencia (en el caso de *L. monocytogenes* con 500 ppm de citral a pH 4,0) y más de 3 ciclos de diferencia (en *L. monocytogenes* con 500 ppm de carvacrol a pH 4,0 y en *E. coli* MG1655 con 500 ppm de citral a pH 7,0), obteniéndose en casi todos los casos recuentos por debajo del límite de detección.

Este incremento en el grado de inactivación de las células sésiles al ser disgregadas de forma previa al tratamiento se puede atribuir, por tanto, a la destrucción parcial de la matriz extracelular, a la separación de agregados celulares y la consiguiente facilitación del acceso de los CIs a las bacterias que formaban parte de las biopelículas. Esta acción protectora de la matriz extracelular frente a la acción bactericida del carvacrol y el citral apoya, en estos antimicrobianos, la segunda de las hipótesis planteadas al comienzo de esta sección.

No obstante, adicionalmente, en el presente estudio también se aplicaron las mismas condiciones de tratamiento sobre células planctónicas (y por tanto no diferenciadas fenotípicamente como células-biopelícula) y se comparó su resistencia frente a carvacrol y citral con la de las células sésiles disgregadas y las células sésiles pertenecientes a biopelículas. Los resultados de estos ensayos preliminares mostraron una resistencia de las células planctónicas similar a la de las células sésiles disgregadas frente a cada tratamiento, y por tanto una resistencia menor que la mostrada por las células sésiles que forman parte de biopelículas (datos no mostrados). Estos resultados en conjunto parecerían descartar la primera hipótesis, es decir, el efecto de una diferenciación fenotípica específica capaz de incrementar la resistencia de las células sésiles frente al carvacrol y al citral. No obstante, para confirmar estos resultados, sería

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

necesaria la identificación de genes activados o reprimidos en las células de fenotipo-biopelícula con respecto a las células planctónicas.

Desde un punto de vista práctico, la formación de biopelículas supone un gran problema en la industria alimentaria debido no solo a su resistencia física sino también a su elevada capacidad para sobrevivir frente a tratamientos con desinfectantes, ya sean naturales a químicos. En este sentido, el aumento de la eficacia del carvacrol y el citral al aumentar la temperatura de tratamiento constituye una importante ventaja a tener en cuenta en el diseño de nuevos procedimientos de limpieza y desinfección encaminados a sustituir los desinfectantes tradicionales por antimicrobianos presentes en aceites esenciales.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

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

- Al evaluar la inactivación de células de biopelículas maduras de *L. monocytogenes* EGD-e y de *E. coli* MG1655 a 37°C durante 60 min, se logró reducir la población de células viables en 0,5 – 2 ciclos logarítmicos debido a la acción de 500 ppm de carvacrol o citral en tratamientos tamponados a pH 4,0 o 7,0. En ambos microorganismos y para ambos CIs la proporción de células inactivadas de las biopelículas fue ligeramente superior a pH ácido.
- Al aumentar la temperatura de tratamiento a 45°C, se consiguió aumentar la eficacia de los tratamientos realizados a 37 °C en 1,5 – 2 ciclos logarítmicos adicionales (en *L. monocytogenes* EGD-e) o 0,5 – 1,5 ciclos logarítmicos adicionales (en *E. coli* MG1655), observando una potenciación de la capacidad del carvacrol y del citral para inactivar células sésiles al aumentar solamente en 8°C la temperatura de tratamiento.
- En todos los tratamientos aplicados, las biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e fueron más resistentes que las de *E. coli* MG1655 a la inactivación por CIs.
- En todos los tratamientos aplicados el carvacrol fue más efectivo que el citral, y se observó un ligero efecto sinérgico entre ambos compuestos al combinar 250 ppm de cada uno de ellos en los tratamientos a 37°C.
- Las células sésiles de las biopelículas presentan una mayor resistencia a la inactivación por carvacrol y citral que las células planctónicas debido, al menos parcialmente, a la protección física que les confiere la matriz de EPS y la propia agregación celular. Esto se deduce de la mayor inactivación obtenida en las células sésiles cuando se disgregan justo antes de los tratamientos con CIs, y similar a la mostrada por células planctónicas frente a los mismos tratamientos.

CONCLUSIONES

- Tratamientos a 45°C durante 60 min con 500 ppm de carvacrol o citral lograron reducir la población de células viables de biopelículas de *L. monocytogenes* EGD-e o *E. coli* MG1655 en un rango de 3 – 5 ciclos logarítmicos. Además, al aumentar la concentración de estos CIs a 1000 ppm, se alcanzaron o superaron los 5 ciclos de inactivación de las células sésiles de las biopelículas. Estos resultados apoyan la posibilidad de utilizar compuestos presentes en aceites esenciales como desinfectantes o coadyuvantes con el objetivo de controlar la diseminación de células infectantes provenientes de biopelículas en las industrias agroalimentarias.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) (2010). “Riesgos microbiológicos asociados al consumo de determinados alimentos por la población.”
- 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 and Emerging Technologies **12**:320–329.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Gelaw, T. K., Lamo-Castellví, S., Pagán, R., García-Gonzalo, D. (2013). “New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol.” Journal of applied microbiology **114**: 173-185.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., Atroshi, F. (2004). "Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms." Journal of Pharmaceutical Sciences**7**:55-64.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R. (2005). "Biofilms: the matrix revisited." Trends in Microbiology **13**:20-26.
- Bremer, P. J., Fillery, S., Mc Quillan, 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**: 254 – 262.
- Burt, S.A. (2014). "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review." International Journal of Food Microbiology**94**: 223–253.
- Davey, M. E., O’Toole, G. A. (2000). “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.” Microbiology and Molecular Biology Reviews**64**(4): 847-867.

BIBLIOGRAFÍA

- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: Microbial Life on Surfaces." Emerging Infectious Diseases **8**(9):881-890.
- Edstrom (2003). "The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems." Second Edition by Paula H. Dreeszen.
- FAO (2003). "Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos." Estudio FAO alimentación y nutrición **76**.
- Fernández, A. (2015). "Eliminación de biopelículas microbianas mediante el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural." Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Zaragoza.
- 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." Tesis de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- 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.
- 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.
- Kuda, T., Yano, T., Kuda, M.T. (2008). "Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface." LWT **41**:988-993.
- Lasa, I. (2004). "Biofilms bacterianos." Actualidad: SEM **37**:14-18.
- Lasa, I., Pozo, J.L., Penadés, J.R., Leiva, J. (2005). "Biofilms bacterianos e infección." Anales del sistema sanitario de navarra **28**(2):163-175.

BIBLIOGRAFÍA

- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010).” Biofilms”. Cold Spring Harbor perspectives in biology **2**(7).
- Mackey, B.M., (2000). Injured bacteria. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), “The Microbiological Safety and Quality of Food.” Aspen Publisher, Inc., Gaithersburg 315–341.
- Mah, T.F.C., O'Toole, G.A., (2001). “Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents.” Trends in microbiology**9**: 34-39.
- Martínez, A., Ferrer, C., Piña, M.C. (2005). “Tecnologías emergentes e inocuidad alimentaria.” Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos**364**: 37-41.
- Michanie, S. (2004). “Listeria monocytogenes: La bacteria emergente de los 80.” Ganados & Carne. Buenos Aires, Argentina 1-8.
- Nazar, J. (2007). “Biofilms bacterianos.” Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello **67**(1): 161-172.
- 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 49-79.
- Nuñez, L., D' Aquino, M. (2012). "Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*)." Brazilian Journal of Microbiology1255-1260.
- OMS (1999). "La inocuidad de los alimentos en el siglo XXI." Boletín de la Organización Mundial de la Salud **77**(4):347-351.
- OMS. (2015). World health day 2015. Food Safety.
- Ramirez, M. S., Tolmasky, M. E. (2010). “Aminoglycoside modifying enzymes.” Drug Resistance Updates **13**(6): 151-171.

BIBLIOGRAFÍA

- Saá, P. (2011). "Biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. Resistance to industrial biocides and cross-response caused by adaptation to benzalkonium chloride." Tesis doctoral. Doutoreuropeus. Universidad deVigo.
- Serra, G. P. (2003). "Estudio del Biofilm: Formación y Consecuencias." Escola de Prevenció i Seguretat Integral.
- 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.
- Szczepanski, S., Lipski, A. (2014). "Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation." Food Control **36**(1): 224-229.
- Villamayor, A. (2015). "Eliminación de biopelículas mediante el uso de antimicrobianos naturales." Trabajo de Fin de Máster, Universidad de Zaragoza.

