



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTI-BIOFILM DE COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI PRESENTES EN LA INDUSTRIA CÁRNICA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE  
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA.

ALUMNO/A: Sara da Silva Janeiro

TUTORA ACADEMICO: Ana I. Jiménez Belenguer  
TUTORA EXTERNO: María Ruiz Rico

*Curso Académico: 2018/2019*

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2019

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTI-BIOFILM DE COMPUESTOS DE ACEITES ESENCIALES EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRESENTES EN LA INDUSTRIA CÁRNICA

Sara Da Silva Janeiro<sup>1</sup>, Ana I. Jiménez Belenguer<sup>2</sup>, María Ruiz Rico<sup>3</sup>, José M. Barat<sup>3</sup>

### RESUMEN

La contaminación microbiana representa un riesgo para la salud pública. Cada vez se detectan más resistencias bacterianas en el ámbito de la industria alimentaria y urge lograr alternativas para combatir esta problemática. Uno de los principales mecanismos de resistencia desarrollado por las bacterias es la formación de biopelículas o biofilms. Entre los microorganismos patógenos más frecuentemente encontrados en forma de biofilm, destaca *Escherichia coli*. En este estudio se analizó la capacidad antimicrobiana de diversos componentes de aceites esenciales (carvacrol, eugenol, timol y vainillina) frente a cepas de *E. coli* aisladas en superficies de una industria cárnica. Por otra parte, se evaluó también el efecto anti-biofilm de dichos compuestos en tres superficies: poliestireno, polietileno y acero inoxidable. Los cuatro compuestos de aceites esenciales fueron efectivos en la reducción de la actividad bacteriana y en la inhibición de la formación de biofilms de las cepas de *E. coli* analizadas. Los hallazgos encontrados indican que los componentes de aceites esenciales podrían ser aplicados en un futuro como alternativas válidas a los agentes biocidas convencionales.

**PALABRAS CLAVE:** anti-biofilm, antimicrobiano, *Escherichia coli*, industria cárnica, compuestos de aceites esenciales.

### ABSTRACT

Microbial contamination represents a risk to public health. More and more often bacterial resistances are detected in the food industry field, which makes it crucial to develop alternatives to face this problem. One of the main resistance mechanisms developed by bacteria is the biofilm's formation. Among the most found pathogens, *Escherichia coli* stands out. In this study, the antimicrobial capacity of carvacrol, eugenol, thymol and vanillin were analyzed against *E. coli* strains isolated from meat industry's surfaces. On the other hand, it was also tested the antibiofilm effect of these compounds on three surfaces: polystyrene, polyethylene and stainless steel. The four essential oil compounds were effective in reducing the bacterial activity and inhibiting the biofilm formation of the *E. coli* strains that were analyzed. These

<sup>1</sup> Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

<sup>3</sup> Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Departamento de Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.



findings suggest that the compounds under study may be applied in the future as a valid alternative to conventional biocidal agents.

KEY WORDS: antibiofilm, antimicrobial, *Escherichia coli*, meat industry, essential oil compounds.

## RESUM

La contaminació microbiana representa un risc per a la salut pública. Cada vegada es detecten més resistències bacterianes en l'àmbit de la indústria alimentària i urgeix aconseguir alternatives per combatre aquesta problemàtica. Un dels principals mecanismes de resistència desenvolupats per les bactèries és la formació de biofilm. Entre els patògens més freqüentment trobats, destaca *Escherichia coli*. En aquest estudi es va analitzar la capacitat antimicrobiana del carvacrol, eugenol, timol i vainil·lina en soques d'*E. coli* provinents de la indústria càrnia. D'altra banda, es va avaluar també l'efecte anti-biofilm d'aquests components en tres superfícies: poliestirè, polietilè i acer inoxidable. Els quatre compostos d'olis essencials van ser efectius en la reducció de l'activitat bacteriana i en la inhibició de la formació de biofilm de les soques d'*E. coli* analitzades. Les troballes observats indiquen que els compostos en estudi poden ser aplicats en un futur com alternatives vàlides als agents biocides convencionals.

PARAULES CLAU: anti-biofilm, antimicrobià, *Escherichia coli*, indústria càrnia, compostos d'olis essencials.

## 1. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos se garantiza a través del uso de técnicas de conservación y adecuadas medidas de higiene, incluyendo el uso de biocidas efectivos. Sin embargo, en los últimos años se han descrito resistencias microbianas a los desinfectantes sintéticos convencionales. Los estudios más recientes admiten que uno de los principales mecanismos de resistencia de las bacterias se lleva a cabo a través de la formación de biopelículas o biofilms (término encontrado frecuentemente en la literatura científica española, dada su aceptabilidad y uso extendido).

El biofilm microbiano se define como un conjunto de células con actividad biológica, capaces de adherirse a superficies abióticas o bióticas. La etapa inicial comienza con la adhesión reversible a la superficie. En bacterias Gram negativas se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli tienen un papel importante en esta adherencia primaria. Tras este paso, las células secretan sustancias poliméricas extracelulares, promoviendo una fijación irreversible. Así, se forma una capa de hidrogel, la cual representa una barrera física a los agentes externos del medio ambiente. Esto les confiere gran resistencia al estrés al que están expuestas. Uno de los principales patógenos formadores de biofilm descritos en la industria alimentaria es la *Escherichia coli* (Giaouris et al., 2018; Stratakos y Grant, 2018).

Los brotes transmitidos por *E. coli*, representan una preocupación emergente a nivel global. Su presencia en la industria alimentaria se debe principalmente al procesamiento de alimentos junto a la contaminación cruzada de superficies y al uso de agua contaminada (Xu et al., 2008). Se ha constatado que las cepas de *E. coli* han desarrollado una elevada tolerancia a la temperatura, presión y diversos mecanismos de resistencia a factores externos (Galie et al., 2018).

Se ha comprobado que las cepas de *E. coli* pueden adherirse a una gran variedad de materiales usados en diversas superficies de la industria alimentaria, como acero inoxidable (AI), vidrio, poliestireno (PS) y polietileno (PE). Por otra parte, se ha verificado también que la hidrofobicidad del material es fundamental para la formación del biofilm en cepas de *E. coli* (Galie et al., 2018). En las superficies del sector cárnico, este hallazgo representa un peligro para sus consumidores, tanto a nivel de calidad de los productos bien como a nivel de salud pública. De hecho, la industria de la carne es la menos confiable por parte de los consumidores, posiblemente debido a los brotes alimentarios asociados a la carne y sus derivados.

Ante el incremento de resistencias a desinfectantes empleados en la industria, su alto impacto ambiental y sus posibles efectos tóxicos si son utilizados en dosis extremadamente altas, urge la necesidad de buscar nuevas alternativas efectivas ante esta problemática (Vazquez-Sanchez et al., 2019). Además, existe una percepción pública negativa en lo que concierne a los desinfectantes convencionales aplicados en la industria alimentaria (Calo et al., 2015).

Los componentes de aceites esenciales (CAE) han demostrado poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Burt, 2004) y podrían ser una

opción adecuada para prevenir y tratar la contaminación microbiana. Además, los consumidores perciben de forma muy positiva el uso de antimicrobianos de origen natural como los compuestos derivados de plantas.

Entre los distintos CAE con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, destacan los terpenoides como el carvacrol o timol presentes en los aceites esenciales de orégano y tomillo, y los fenilpropenos como el eugenol, presente en el aceite esencial de clavo, y la vainillina procedente de la vainilla (Hyldgaard et al., 2012). Los mecanismos de acción de los CAE no se encuentran aun totalmente esclarecidos, pero se destacan los siguientes: alteraciones de los sistemas enzimáticos bacterianos, modificaciones en la estructura y función de la membrana celular, afectar el material genético o a través de la peroxidación lipídica (Aziz y Karboune, 2018).

La actividad antimicrobiana de los CAE ha sido ampliamente estudiada frente a células bacterianas planctónicas, pero la actividad anti-biofilm de estos antimicrobianos naturales ha sido descrita para algunos microorganismos alterantes y patógenos en los últimos años (de Oliveira et al., 2012; Perez-Conesa et al., 2006). Por tanto, el objetivo de este trabajo de fin de máster fue determinar la actividad antimicrobiana y anti-biofilm de los CAE carvacrol, eugenol, timol y vainillina para el control de cepas de *E. coli* presentes en las superficies de una industria cárnica localizada en Turquía.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestreo y aislamiento

Las muestras analizadas provinieron de una industria cárnica ubicada en Ankara (Turquía), responsable de la producción de carne y derivados cárnicos como salchichas, carne frita y albóndigas, entre otros. Las muestras fueron recogidas en enero de 2017 en tres superficies de producción distintas: la línea inferior de la cinta transportadora de deshuesado (UN), la línea superior de la cinta transportadora de deshuesado (UP) y una unidad de envasado al vacío (VP). Las dos primeras superficies mencionadas se encontraban en la misma división, mientras que la VP se encontraba en otra estancia de la industria.

El muestreo de las superficies fue llevado a cabo después de la limpieza habitual de la planta. Esta se efectúa en las superficies y en el suelo de la industria, recurriendo a desinfectantes a base de cloro o de amonio cuaternario durante 30 min.

Todas las muestras fueron recogidas en duplicado, de superficies de 5 × 5 cm con hisopos de algodón estériles. A continuación, se inocularon dichas muestras en tubos de ensayo con 10 mL de caldo de tripticasa soja (TSB), incubando a 37 °C durante 24 h. Los tubos de ensayos positivos tras la incubación fueron sembrados en placas de plate count agar (PCA) por duplicado. Ambos medios fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, Spain). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, tras lo que se llevó a cabo

un segundo pase en medio de cultivo PCA. Tras esto, los cultivos fueron almacenaron con glicerol a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La preparación de los inóculos en medio líquido se realizó mediante la suspensión directa de una colonia aislada tomada de una placa de un cultivo puro. La colonia se transfirió a un tubo con 10 mL de TSB, el cual se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

Tanto el muestreo como el aislamiento de las muestras fueron realizados por terceros (los responsables del inicio de este proyecto). Sin embargo, se menciona como se procedió para la mejor comprensión del presente estudio.

## 2.2. Identificación, caracterización bioquímica y fenotípica

A fin de identificar las cepas de *E. coli*, se seleccionaron veinte cultivos bacterianos puros para su identificación por métodos tradicionales. Las muestras fueron sometidas a tinción de Gram, cultivo en medios selectivos y reacciones bioquímicas, conforme el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Boone et al., 2011). Según los resultados de la tinción de Gram, se cultivaron las cepas Gram negativas en el medio selectivo TBX (agar con Triptona-Bilis-X-glucurónido) incubando a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. El medio selectivo fue adquirido en Scharlab (Barcelona, Spain). La prueba de catalasa se realizó usando una colonia aislada de las placas de PCA en una lámina de vidrio; en presencia de la enzima catalasa, al adicionar una gota de peróxido de hidrógeno al 3%, ésta neutraliza el reactivo en oxígeno y agua. El resultado es positivo si se detecta la formación de burbujas de oxígeno. Para la prueba de citocromo oxidasa, se inocularon tiras de Bactident® Oxidase (Merck, Darmstadt, Alemania) en los cultivos. El resultado se observa a través de la oxidación del reactivo, con cambio de color (azul a granate).

Por otra parte, se recurrió al uso de kits de prueba rápida para identificar especies y familias específicas, como *Enterobacteriaceae*, a la cual pertenece *E. coli*. La familia de *Enterobacteriaceae* fue identificada usando tiras API20E. Las tiras API fueron proporcionadas por bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia). Los resultados fueron evaluados por el software APIweb™ de acuerdo con sus bases de datos para la identificación de microorganismos.

## 2.3. Detección y cuantificación de la formación de biofilm

Tras la identificación se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de formación de biofilm de las 6 cepas aisladas en la industria cárnica. La producción de biopelículas en superficies de poliestireno se cuantificó de acuerdo con el método descrito por Cherif-Antar (2016) con modificaciones menores. Para este propósito, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de TSB a placas microtituladoras de 96 pocillos. Los pocillos fueron inoculados con 1  $\mu\text{L}$  de un cultivo de las cepas en TSB durante 24 h para obtener una concentración celular final de  $10^6$  UFC/mL. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Tras la incubación, se lavaron los pocillos tres veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS), a fin de eliminar las células planctónicas no

adheridas. Tras el secado, las placas se tiñeron con cristal violeta (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) al 0,1% durante 15 min, y después se realizó un lavado con agua destilada estéril para eliminar el exceso del colorante. Las placas fueron secadas durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la solubilización del colorante con una solución de ácido acético al 33% para la detección y cuantificación de la formación de biofilm. La adherencia de las células fue medida por absorbancia a 595 nm usando un fotómetro de placa de microtitulación automático (Thermo Scientific Multiskan FC, Vantaa, Finlandia).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las bacterias fueron clasificadas en cuatro categorías: sin formación de biofilm ( $DO < DO_C$ ), formación débil ( $DO_C < DO \leq 2x DO_C$ ), formación moderada ( $2x DO_C < DO \leq 4x DO_C$ ) o fuerte formación de biofilm ( $DO > 4x DO_C$ ). Se consideró como control negativo ( $DO_C$ ) la absorbancia de los pocillos no inoculados. Como control positivo, fue utilizada la cepa *Staphylococcus epidermidis* (CECT 101), obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España), la cual posee una gran capacidad formadora de biofilm. El ensayo fue realizado con al menos 10 repeticiones de cada cepa.

#### 2.4. Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

Una vez determinada la capacidad de formación de biofilm, se determinó la susceptibilidad de dos de las cepas aisladas con mayor capacidad de formación de biofilm (UN3 y UP5) a cuatro antimicrobianos naturales presentes en aceites esenciales: carvacrol ( $\geq 99\%$  m/m), eugenol (99% m/m), timol (99% m/m), (Sigma-Aldrich, Barcelona, España) y vainillina ( $> 99\%$  m/m) (Ventós, Barcelona, España).

La actividad antimicrobiana de dichos compuestos fue evaluada a través del método de macrodilución. Para ello, se prepararon previamente soluciones madre de cada CAE en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Barcelona, España). En matraces Erlenmeyer, se añadieron 15 mL de TSB como caldo de cultivo. A posteriori se adicionó el volumen necesario para lograr la concentración final pretendida para cada CAE. Para el carvacrol y timol, se prepararon las siguientes concentraciones: 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 y 0,25 mg/mL. En relación al eugenol, se evaluaron las concentraciones de 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 mg/mL. Para la vainillina se utilizaron las concentraciones de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mg/mL.

En cada matraz se inocularon 5  $\mu$ L de un inóculo de la cepa de 24 h, para lograr una concentración celular inicial de  $10^6$  UFC/mL. Los matraces fueron incubados con agitación orbital (150 rpm) a 37 °C durante 24 h.

Para cuantificar las células viables, se realizó una serie de diluciones decimales de cada muestra en agua estéril destilada. A continuación, 100  $\mu$ L de las muestras fueron sembrados en placas de PCA, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Tras la incubación de las placas Petri se llevó a cabo el recuento y los resultados se expresaron como UFC/mL. Los valores obtenidos fueron

transformados logarítmicamente y expresados como log UFC/mL, con un límite de detección de 5 UFC/mL. Los análisis fueron realizados por triplicado, incluyendo controles positivos (caldo de cultivo inoculado sin antimicrobianos) para establecer el crecimiento del microorganismo en ausencia de tratamiento, y negativos (caldo de cultivo no inoculado en presencia de los antimicrobianos) para confirmar la ausencia de contaminación.

## **2.5. Inhibición de la formación de biofilm en diferentes superficies en presencia de los componentes de aceites esenciales**

Una vez establecida la actividad antimicrobiana de los CAE en medio líquido frente a las cepas de *E. coli* con alta capacidad para la formación de biofilm, se llevó a cabo el estudio de estos antimicrobianos naturales para inhibir la formación de biofilm microbiano. El método empleado para evaluar la inhibición de la formación de biofilm en distintas superficies en presencia de los antimicrobianos objeto de este estudio fue el método de tinción de cristal violeta.

Para cuantificar la formación de biofilm en las superficies de PS se utilizó el método descrito anteriormente en la sección 2.3. El ensayo se realizó en placas de microtitulación. Para lograr una concentración celular de  $10^6$  UFC/mL, se inoculó 1  $\mu$ L de un cultivo de 24 h de las cepas seleccionadas de *E. coli* (UN3 y UP5) en 200  $\mu$ L de TSB. Se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se lavaron los pocillos con PBS tres veces, a fin de eliminar las células planctónicas no adheridas. A continuación, se adicionó a los pocillos con el biofilm el caldo de cultivo con la concentración de CAE correspondiente a la CMB establecida en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (sección 2.4). Para ello, se añadieron 200  $\mu$ L de los CAE disueltos en TSB a los pocillos, y las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se lavaron las placas, se tiñeron con cristal violeta al 0,1% durante 15 min, se lavaron con agua destilada estéril para eliminar el exceso del colorante y se secaron las placas durante 15 min a temperatura ambiente y se solubilizó el colorante con ácido acético al 33%. La adherencia de las células fue cuantificada mediante el cálculo de la absorbancia a 595 nm. El ensayo fue realizado con al menos 10 repeticiones de cada cepa y de cada tratamiento.

Por otra parte, se evaluó también la capacidad de inhibición de formación de biofilm de los antimicrobianos en estudio en otros dos materiales presentes en las superficies de la industria cárnica en estudio: muestras de PE de la cinta transportadora de la industria y muestras de Al. Ambos materiales fueron expuestos a un lavado previo al ensayo. Las porciones de PE (3 × 1,5 × 1 cm) se lavaron con una solución detergente durante 10 min seguido de un lavado con agua destilada. Para esterilizarlos, se sumergieron los trozos en etanol al 70% durante 15 min tras lo que se secaron en condiciones estériles. En relación al Al, las porciones de material (2 × 1 × 0,1 cm) se lavaron con acetona durante 30 min, seguido de un lavado con una solución detergente

durante 10 min, y un lavado con agua destilada. Por último, las muestras fueron esterilizadas a 121 °C durante 15 min.

El paso subsecuente consistió en introducir las porciones de ambos materiales esterilizados en tubos tipo Falcón con 30 mL de TSB. Se adicionaron 30 µL de inóculo de las cepas seleccionadas (UN3 y UP5) para alcanzar una concentración final de 10<sup>6</sup> UFC/mL, seguidamente se incubó a 37 °C durante 24 h, para promover la adhesión celular. Tras la incubación, las muestras de los materiales se lavaron 3 veces con PBS estéril. Posteriormente, se añadieron 30 mL de TSB estéril más el volumen necesario de cada solución stock de los CAE para lograr la concentración CMB determinada anteriormente. Se incubaron una vez más en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Tras esto, las muestras se lavaron con PBS estéril y se tiñeron con 10 mL de cristal violeta al 0,1% durante 15 min. Se procedió al lavado con agua destilada estéril para retirar el exceso de colorante con posterior secado a temperatura ambiente y se solubilizó el colorante con ácido acético al 33%. Se transfirieron las muestras a una placa de microtitulación y se midió la absorbancia a 595 nm.

## 2.6. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y en los ensayos anti-biofilm para establecer las propiedades antimicrobianas de los CAE se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA simple). El procedimiento LSD (least significant difference) se usó para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%. Los datos fueron procesados estadísticamente con el software Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, EEUU).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Identificación, caracterización bioquímica y fenotípica

Tras el muestreo, se aislaron veinte cultivos bacterianos puros con el objetivo de identificar las cepas de *E. coli* presentes en la industria cárnica. Los resultados de la identificación y caracterización bioquímica y fenotípica establecieron 6 cepas de *E. coli* entre las muestras recogidas. Esta bacteria se encuentra frecuentemente en el tracto intestinal de los animales, siendo este el principal motivo por lo cual se detecta en la industria cárnica.

Sin embargo, su patogenicidad no quedó clara según los resultados de identificación bioquímica y fenotípica, ya que esta bacteria presenta una gran variabilidad a nivel metabólico y fisiológico incluyendo tanto cepas comensales de la flora intestinal humana y animal así como cepas patógenas intestinales y extraintestinales (Köhler y Dobrindt, 2011).

### 3.2. Capacidad de formación de biofilm de las cepas de *E. coli* aisladas

Tras la identificación, se evaluó la capacidad de formación de biofilm de las 6 cepas de *E. coli* aisladas usando como superficie modelo el PS. Los resultados del ensayo se encuentran descritos en la Tabla 1.

**TABLA 1.** Cuantificación de la capacidad de formación de biofilm de las cepas de *E. coli* aisladas (Media y desviación estándar, n=10).

		Absorbancia <sup>a</sup>	Formación biofilm <sup>b</sup>
Aislados <i>E. coli</i>	Control (-)	0,176	Moderada
	Control (+)	0,532	Moderada
	UN2	0,426	Moderada
	<b>UN3</b>	<b>0,643</b>	<b>Moderada</b>
	UP1	0,624	Moderada
	UP2	0,435	Moderada
	UP3	0,489	Moderada
	<b>UP5</b>	<b>0,650</b>	<b>Moderada</b>

<sup>a</sup> Absorbancia cuantificada a 595 nm;

<sup>b</sup> formación moderada ( $2x DO_c < DO \leq 4x DO_c$ ).

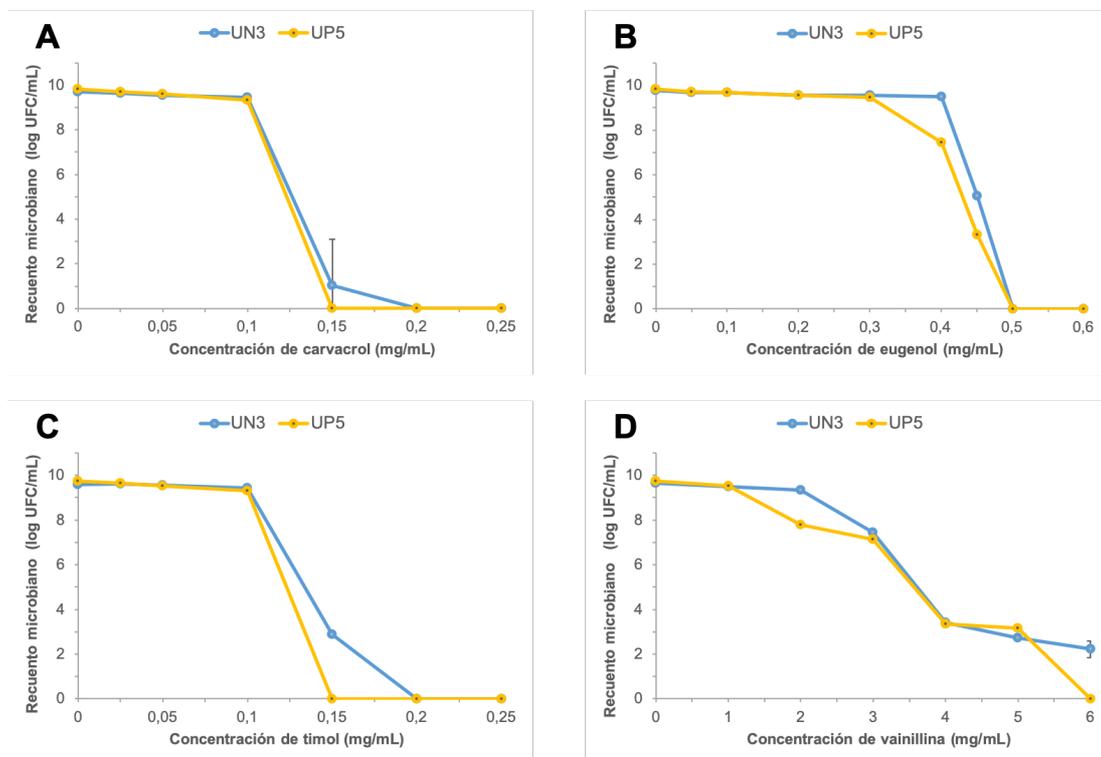
En el caso de las cepas en estudio, se puede observar que todas fueron catalogadas con una capacidad de formación de biofilm moderada. Las muestras UP5 y UN3 fueron las que registraron los valores más altos de absorbancia. Como se ha descrito anteriormente, la formación de biofilm refleja la capacidad de adaptación al estrés y agresiones del medio externo, como los antimicrobianos, favoreciendo la sobrevivencia de las bacterias. En estudios anteriores, *E. coli* demostró tener la capacidad de adherirse a superficies (Al-Shabib et al., 2017; Carter et al., 2016).

Así, se eligieron las dos cepas con valores de absorbancia más elevados (UN3 y UP5) para proseguir con los ensayos de sensibilidad antimicrobiana e inhibición de la formación de biofilm en presencia de los antimicrobianos en estudio.

### 3.4. Actividad antimicrobiana de los componentes de aceites esenciales

Una vez seleccionadas las cepas aisladas con mayor capacidad de formación de biofilm, se estableció la actividad inhibitoria de cuatro CAE (carvacrol, eugenol, timol y vainillina) frente a las cepas de *E. coli* UN3 y UP5. Se pueden observar los resultados obtenidos en la Figura 1, donde se representa gráficamente el recuento microbiano de ambas cepas tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los antimicrobianos.

Se comprueba que el carvacrol y el timol inhibieron las cepas de *E. coli* en concentraciones más bajas, de 0,15 y 0,2 mg/mL (UP5 y UN3, respectivamente), en comparación con los otros CAE. Los resultados establecidos contrastan con varios estudios publicados, donde se observa una concentración mínima inhibitoria entre 0,2-0,35 mg/mL para el carvacrol y entre 0,18-0,25 para el timol (García-Salinas et al., 2018; Du et al., 2015; Xu et al., 2008; Ben Arfa et al., 2006). En relación al eugenol, fueron necesarias concentraciones superiores a 0,5 mg/mL para inhibir completamente el microorganismo. Una vez más, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por otros autores (García-Salinas et al., 2018; Ruiz-Rico et al., 2017).



**FIGURA 1.** Recuento microbiano (log UFC/mL) de *E. coli* (UN3 y UP5) tras el tratamiento con diferentes concentraciones de los CAE en estudio: carvacrol (A), eugenol (B), timol (C) y vainillina (D). Media y desviación estándar, n=3.

Por otra parte, la vainillina presentó una menor capacidad antimicrobiana, en comparación con el resto de CAE empleados. De hecho, este compuesto no fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la cepa UN3 a ninguna de las concentraciones evaluadas. En relación a la cepa UP5, se puede observar que la CMB de la vainillina fue de 6 mg/mL. Los resultados obtenidos discrepan de otros estudios publicados previamente. En ellos, se pudo comprobar que la vainillina presentó actividad antimicrobiana con una concentración mínima inhibitoria entre 2,3-2,8 mg/mL para cepas de *E. coli* (Cava-Roda et al., 2010). Por otra parte, según otros autores la vainillina no

presenta una actividad antibacteriana significativa en cepas de *E. coli* resistentes a otros agentes antimicrobianos. No obstante, se ha comprobado que puede tener un efecto sinérgico, cuando está combinada con otros antibacterianos (Brochado et al., 2018; Bezerra et al., 2017). La resistencia observada puede ser derivada de la capacidad de formación de biofilm de estas bacterias, la cual incrementa la resistencia frente a los compuestos antimicrobianos (Jessen y Lammert, 2003).

Cabe destacar que el muestreo de las cepas aisladas fue realizado después de aplicar los desinfectantes del protocolo de limpieza de rutina. *E. coli* tiene características que le permite sobrevivir en productos cárnicos procesados a bajas temperaturas. Así mismo, la prevención y eliminación de su presencia en superficies de contacto en la industria es crítica para evitar el desarrollo de brotes alimentarios. Uno de los objetivos primordiales en la industria cárnica es la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas, algunos CAE y sus compuestos han demostrado poseer propiedades antimicrobianas a bajas temperaturas frente a *E. coli* en esta industria (Calo et al., 2015).

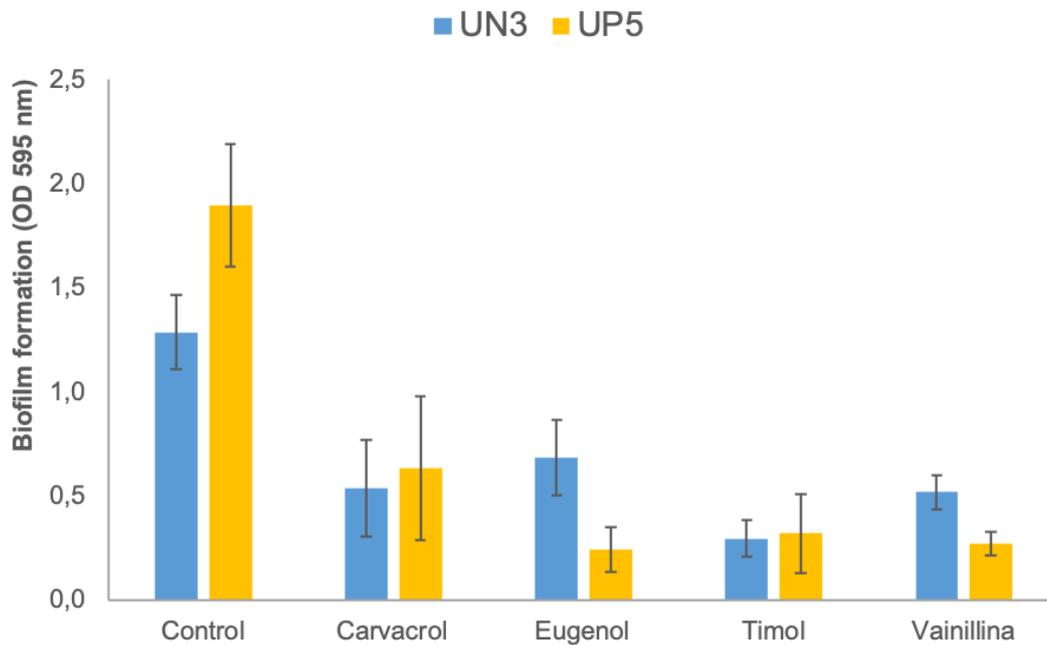
Hay evidencias que la presencia de un grupo hidroxilo (-OH) en la estructura de los compuestos fenólicos, como los CAE analizados, tiene un papel clave en la actividad antimicrobiana. Su posición compromete la efectividad del tratamiento. Este hecho podría explicar el potencial antimicrobiano más elevado del carvacrol, en comparación con otros CAE (Aziz y Karboune, 2018). Aunque el mecanismo de acción de los CAE en estudio no esté completamente esclarecido, son varios los artículos que describen la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Se han descrito alteraciones a nivel morfológico, como lisis y pérdida de la integridad de la membrana celular, conllevando a la muerte de las células bacterianas (García-Salinas et al., 2018).

### **3.5. Actividad anti-biofilm de los componentes de aceites esenciales en diferentes superficies**

La capacidad de formación de biofilm de las cepas de *E. coli* UN3 y UP5 en presencia de los CAE fue evaluada en tres tipos de superficies de la industria cárnica: PS, PE y AI. En la Figura 2 se observa la influencia de los CAE sobre la capacidad de formación de biofilm para la superficie PS.

Como se puede ver en la figura, los CAE estudiados presentaron capacidad anti-biofilm con resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ), comparados con el control.

El timol y el carvacrol mostraron una capacidad de reducción del biofilm aproximadamente del 80% y 63%, respectivamente. Los resultados objetivos son similares a los obtenidos en otros estudios anteriores, donde se destaca la alta capacidad de inhibición de la formación de biofilm de estos dos compuestos (Lee et al., 2017; Du et al., 2015).



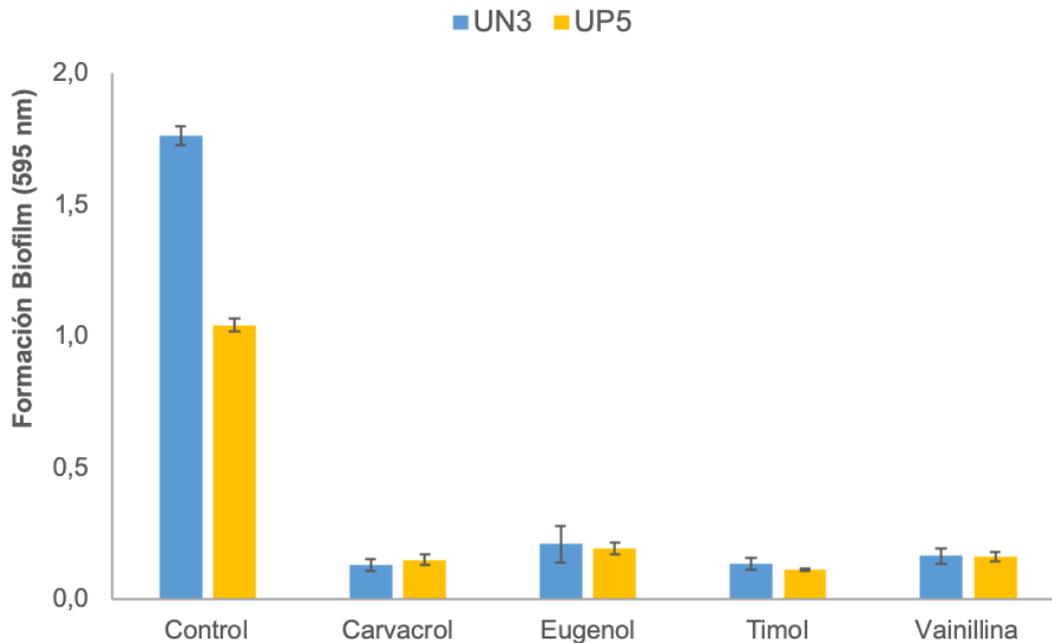
**FIGURA 2.** Inhibición de la formación de biofilm de las cepas de *E. coli* (UN3 y UP5) en la superficie de PS en presencia de carvacrol, eugenol, timol y vainillina. Media y desviación estándar, n=10.

Sin embargo, el eugenol mostró también un porcentaje de inhibición de la formación de biofilm cerca del 67%, situándose entre los dos últimos compuestos mencionados. La literatura encontrada describe resultados similares para este compuesto, entre el 50–87% de inhibición, dependiendo de la cepa de *E. coli* investigada (Kim et al., 2016). Por otra parte, la vainillina fue capaz de inhibir aproximadamente un 73% la formación de biofilm en PS. Aunque como antimicrobiano pueda ser menos efectivo, hay varios estudios que comprueban su efectividad como agente anti-biofilm (Chenia, 2015).

La comparación de los resultados obtenidos para las cepas UN3 y UP5 en esta superficie, no mostró diferencias significativas a nivel estadístico, por lo que el efecto anti-biofilm fue equivalente para ambas cepas de *E. coli*.

Se estudió también la actividad anti-biofilm en otros dos materiales de superficie presentes en la industria cárnica: PE y AI. Los resultados se reflejan en las Figuras 3 y 4. En general, se verificó una disminución significativa del biofilm formado para todos los CAE testados.

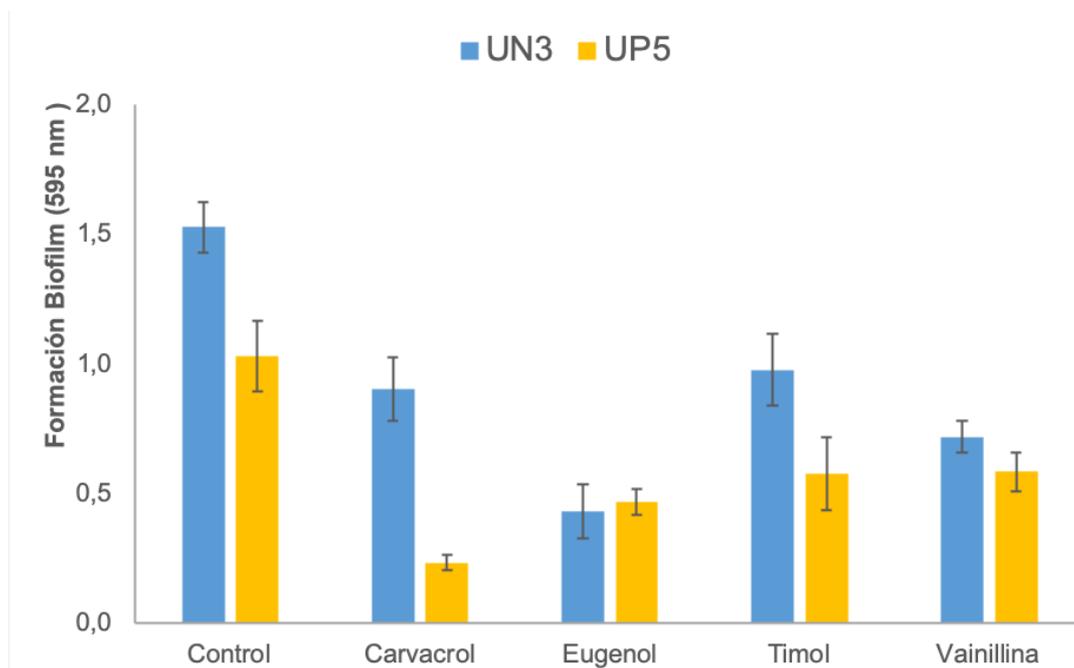
El análisis estadístico expuso que todos los compuestos fueron capaces de reducir significativamente la presencia de biofilm, tanto en el PE como en el AI, comparativamente a los respectivos controles. Para el AI, se constata que hubo una reducción aproximadamente del 90% en la formación de biofilm (Figura 3).



**FIGURA 3.** Inhibició de la formació de biofilm de les cepes de *E. coli* (UN3 i UP5) en la superfície de Al en presència de carvacrol, eugenol, timol i vainillina. Mitjana i desviació estàndard, n=3.

Per a ambdues cepes, els CAE més efectius van ser el carvacrol i el timol. Comparant els resultats de les cepes UN3 i UP5 en l'Al, s'observen diferències significatives a nivell estadístic. L'efecte anti-biofilm del carvacrol va ser superior per a la cepa UN3, mentre que el timol va ser capaç d'inhibir la UP5 en major escala. Ambdós han demostrat posseir una forta activitat anti-biofilm en bacteris patògens (Yousef et al., 2017).

Analitzant els resultats obtinguts en la superfície de PE (Figura 4), es pot observar que els compostos ensayats van demostrar resultats bastant heterogenis. Per a la cepa UN3, l'eugenol va ser el més efectiu en la reducció de biomassa. En relació a la UP5, el carvacrol té major poder d'inhibició de la formació de biofilm. Una vegada més, els resultats obtinguts quan es comparen les dues cepes de *E. coli*, no mostren diferències significatives a nivell estadístic. Així, es pot afirmar que la capacitat anti-biofilm dels CAE en estudi va ser equivalent per a la cepa UN3 i UP5. Aquesta variabilitat de resultats podrà ser derivada de la menor o major capacitat intrínseca de les cepes per produir fimbria i pili, les quals desempeñen un paper crucial en l'adherència de les bacteris a les superfícies i la comunicació entre elles, respectivament (Giaouris et al., 2018; Carter et al., 2016).



**FIGURA 4.** Inhibición de la formación de biofilm de las cepas de *E. coli* (UN3 y UP5) en la superficie de PE en presencia de carvacrol, eugenol, timol y vainillina. Media y desviación estándar, n=3.

En este punto, comparando los resultados obtenidos para PE y AI, la menor inhibición de la formación de biofilm en el PE podría ser debida a las piezas utilizadas en el ensayo. Estas presentaban bastantes rugosidades en la superficie, pudiendo haber sido decisivo para la adherencia de las bacterias y la formación de biofilm. Las células tienen más probabilidad de permanecer atrapadas en las grietas y curvaturas de la superficie, no siendo posible eliminarlas tan fácilmente (Bang et al., 2014).

En general, la formación de biofilms de las cepas de *E. coli* seleccionadas disminuyó significativamente frente a los cuatro CAE aplicados a la CMB. Así mismo, los CAE pueden ser una opción viable para limitar la contaminación de alimentos provocada por biofilms en la industria cárnica (Chouhan et al., 2017)

#### 4. CONCLUSIONES

Este trabajo de fin de máster tuvo como objetivo analizar la capacidad antimicrobiana y anti-biofilm de cepas de *E. coli* aisladas previamente de una industria cárnica. Se concluye que los cuatro CAE han sido efectivos tanto en la reducción del crecimiento microbiano como en la inhibición de la formación de biofilm de las cepas de *E. coli* aisladas en distintas superficies de una industria cárnica en Turquía.

En general, el carvacrol y el timol han sido los CAE más efectivos. Al tratarse de isómeros, sus resultados similares pueden ser debido a este

hecho. Además, fueron los CAE que presentaron una menor concentración efectiva en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Este factor podrá tener relevancia a la hora de estudiar su posible toxicidad y efectos en el material y materia prima que se emplee.

Por otro lado, se observó que la presencia de rugosidades e imperfecciones en el material pudo contribuir a la persistencia de biofilms en la superficie de polietileno. Así, es importante que los materiales empleados en la industria presenten determinadas características estructurales para evitar la formación de biofilms por parte de bacterias patógenas.

Se destaca también que el muestreo de las bacterias aisladas en la industria cárnica se llevó a cabo después del protocolo de limpieza habitual. Por tanto, dichas bacterias podrían ser el foco de infecciones en esa industria, siendo importante rectificar y adoptar medidas de limpieza más efectivas.

Si bien se ha demostrado que los CAE evaluados tienen actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos *in vitro*, suelen ser necesarias concentraciones más elevadas para lograr los mismos resultados *in situ*. Por otra parte, hay que tener en cuenta que podría ocurrir migración de dichos compuestos a los alimentos en contacto con las superficies tratadas previamente con CAE. Estos hallazgos podrían ser una limitación a la hora de utilizar los CAE.

Así mismo, el estudio llevado a cabo podrá contribuir a fomentar la aplicación de otros métodos alternativos novedosos ya en desarrollo. Ejemplos de estos son la inmovilización covalente de los CAE sobre superficies como partículas de sílice o materiales poliméricos o metálicos, logrando una menor concentración del agente biocida y una disminución de la contaminación del medio ambiente y de los alimentos en contacto con las superficies de la industria alimentaria.

Por último, cabe resaltar que las estrategias empleadas en la prevención del riesgo de contaminación microbiológica no pueden descartar la presencia de biofilms en la industria. Los CAE testados podrán ser una opción viable a esta problemática, pero será necesario optimizar su uso y testarlos *in situ*, a fin de averiguar su efectividad y seguridad como tratamiento antimicrobiano y anti-biofilm.

## 5. REFERENCIAS

- Al-Shabib, N. A., Husain; F. M., Ahmad, I.; Khan, M. S.; Khan, R. A.; Khan, J. M. 2017. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 79, 325-332. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.004
- Aziz, M.; Karboune, S. 2018. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(3), 486-511. doi:10.1080/10408398.2016.1194256.
- Bang, J.; Hong, A.; Kim, H., Beuchat, L. R.; Rhee, M. S.; Kim, Y.; Ryu, J. H. 2014. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. *Int J Food Microbiol*, 191, 129-134. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.014
- Ben Arfa, A.; Combes, S.; Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letts Appl Microbiol*, 43(2), 149-154. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x
- Bezerra, C. F.; Camilo, C. J.; do Nascimento Silva, M. K.; de Freitas, T. S.; Ribeiro-Filho, J.; Coutinho, H. D. M. 2017. Vanillin selectively modulates the action of antibiotics against resistant bacteria. *Microb Pathog*, 113, 265-268. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.052
- Boone, D. R.; Castenholz, R. W.; & Garrity, G. M. 2001. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.
- Brochado, A. R.; Telzerow, A.; Bobonis, J.; Banzhaf, M.; Mateus, A.; Selkrig, J.; Typas, A. 2018. Species-specific activity of antibacterial drug combinations. *Nature*, 559(7713), 259-263. doi: 10.1038/s41586-018-0278-9
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Calo, J. R.; Crandall, P. G.; O'Bryan, C. A.; Ricke, S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, 54, 111-119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Carter, M. Q.; Louie, J. W.; Feng, D.; Zhong, W.; Brandl, M. T. 2016. Curli fimbriae are conditionally required in *Escherichia coli* O157:H7 for initial attachment and biofilm formation. *Food Microbiol*, 57, 81-89. doi:10.1016/j.fm.2016.01.006
- Cava-Roda, R. M.; Taboada-Rodríguez, A.; Valverde-Franco, M. T.; Marín-Iniesta, F. 2010. Antimicrobial Activity of Vanillin and Mixtures with Cinnamon and Clove Essential Oils in Controlling *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Milk. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2120-2131. doi:10.1007/s11947-010-0484-4
- Chenia, H. Y. 2015. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde, vanillin and *Kigelia Africana* fruit extracts against fish-associated *Chryseobacterium* and *Myroides* spp. isolates. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 12(3). doi:10.4314/ajtcam.v12i3.7
- Cherif-Antar, A.; Moussa-Boudjemâa, B.; Didouh, N.; Medjahdi, K.; Mayo, B.; Flórez, A. B. 2016. Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 27-38. doi:10.1007/s13594-015-0235-4
- Chouhan, S.; Sharma, K.; Guleria, S. 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils- Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*, 4(3). doi:10.3390/medicines4030058
- de Oliveira, M. r. M. M.; Brugnera, D. F.; do Nascimento, J. A.; Batista, N. d. N.; Piccoli, R. H. 2012. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. *European food research & technology*, 2012 v.234 no.5(no. 5), pp. 821-832. doi:10.1007/s00217-012-1694-y
- Du, E.; Gan, L.; Li, Z.; Wang, W.; Liu, D.; Guo, Y. 2015. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol*, 6, 58. doi:10.1186/s40104-015-0055-7

- Galie, S.; Garcia-Gutierrez, C.; Miguelez, E. M.; Villar, C. J.; Lombo, F. 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol*, 9, 898. doi:10.3389/fmicb.2018.00898
- Garcia-Salinas, S.; Elizondo-Castillo, H.; Arruebo, M.; Mendoza, G.; Irusta, S. 2018. Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules*, 23(6). doi:10.3390/molecules23061399
- Giaouris, E. E.; Simões, M. V. 2018. Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies. In *Foodborne Diseases* (pp. 309-377).
- Hyldgaard, M., Mygind, T.; Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*, 3, 12. doi:10.3389/fmicb.2012.00012
- Jessen, B.; Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 265-269. doi:10.1016/S0964-8305(03)00046-5
- Kim, Y. G.; Lee, J. H.; Gwon, G.; Kim, S. I.; Park, J. G.; Lee, J. 2016. Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of Escherichia coli O157:H7. *Sci Rep*, 6, 36377. doi:10.1038/srep36377
- Köhler, C.-D.; Dobrindt, U. 2011. What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 642-647. doi:10.1016/j.jmm.2011.09.006
- Lee, J. H., Kim, Y. G.; Lee, J. 2017. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic Escherichia coli. *J Appl Microbiol*, 123(6), 1420-1428. doi:10.1111/jam.13602
- Perez-Conesa, D.; McLandsborough, L.; Weiss, J. 2006. Inhibition and inactivation of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot*, 69(12), 2947-2954. doi:10.4315/0362-028x-69.12.2947
- Ruiz-Rico, M.; Perez-Esteve, E.; Bernardos, A.; Sancenon, F.; Martinez-Manez, R.; Marcos, M. D.; Barat, J. M. 2017. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chem*, 233, 228-236. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.118
- Stratakos, A. C.; Grant, I. R. 2018. Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic Escherichia coli on beef. *Food Microbiol*, 76, 209-218. doi:10.1016/j.fm.2018.05.011
- Vazquez-Sanchez, D.; Galvao, J. A.; Mazine, M. R.; Micotti da Gloria, E.; de Souza Vieira, T. M. F. 2019. Anti-biofilm efficacy of single and binary treatments based on plant essential oils against Escherichia coli persistent in food-processing facilities. *Food Sci Technol Int*, 25(5), 385-393. doi:10.1177/1082013219826817
- Xu, J., Zhou, F.; Ji, B. P.; Pei, R. S.; Xu, N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. *Lett Appl Microbiol*, 47(3), 174-179. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x
- Yousef Memar, M., Raei, P.; Alizadeh, N.; Akbari aghdam, M.; Kafil, H. 2017. Carvacrol and thymol; Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*, 28, 63-68. doi:10.1097/MRM.000000000000100