

**Estudio de la capacidad  
antimicrobiana de sustancias  
naturales *in vivo* e *in vitro***

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por Diana Ibáñez Peinado

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia

Directores:

**Dr. D. Antonio Martínez López**

**Dra. Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga**

**Valencia, Abril de 2022**



El Dr. D. Antonio Martínez López, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Dra. Dña. María Dolores Rodrigo Aliaga, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo que presenta Diana Ibáñez Peinado para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia, con el título “Estudio de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales *in vivo* e *in vitro*”, ha sido realizado bajo nuestra dirección, en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman este certificado en Paterna, a Abril de 2022.

**Dr. D. Antonio Martínez López**

**Dra. Dña. M<sup>a</sup> Dolores Rodrigo Aliaga**





---

---

La presente tesis doctoral se enmarca dentro del Programa de Doctorado Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria de la Universidad Politécnica de Valencia.

El trabajo experimental se realizó gracias a fondos del Ministerio de Ciencia e Innovación y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a través del proyecto “Validación de nuevas herramientas y procesos para el análisis y la mejora de la seguridad alimentaria microbiológica: aplicación a nuevas matrices alimentarias” (AGL2017-86840-C2-2-R) del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad.

---

---



A Dios.

A mis padres y a aquellos que desde el cielo me cuidan.



## **AGRADECIMIENTOS**

En este espacio quiero agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible mi desarrollo profesional y personal.

Gracias a mis directores de tesis por haberme dado la oportunidad laboral de la cual me siento muy afortunada haber podido compartir. Agradezco vuestro impulso, comprensión y apoyo académico y experimental durante el recorrido de intensa constancia, paciencia y trabajo conjunto. Gracias por estar ahí siempre que os he necesitado.

Quería dar las gracias a cada una de las personas que han participado en la elaboración y concesión de los proyectos con los cuales he sido contratada estos años.

A cada uno de los compañeros de laboratorio, gracias por los buenos momentos vividos, por aportar vuestro trabajo y esfuerzo en esta tesis. Gracias a Gema, por iniciarme en el laboratorio del IATA, a Temo y María por enseñarme tantas cosas y trabajar codo a codo en todo momento, y gracias a todos los alumnos participantes por hacer un buen equipo.

Gracias a todas las personas que generosamente han prestado materiales y equipos para el avance de mi trabajo.

Así, también doy las gracias a todas aquellas personas maravillosas que se han interesado por la evolución de mi tesis y me han dedicado una sonrisa.

Con amor a mis padres, porque hoy no estaría escribiendo estas palabras sin vuestro apoyo incondicional. Gracias por escucharme y teneros siempre a mi lado.

Gracias a todos aquellos que me cuidan desde arriba. Gracias abuela por ser flor que alegra y pinta de rosa la vida, brindo por ti y por tus ánimos permanentes. Gracias abuelo por enseñarme que la vida es bonita.

Con especial cariño a E.T.R y J.A. por ser pilar siempre y fuente de inspiración. Gracias Juan por tu apoyo en el desarrollo de la tesis. Conocer te ha sido un regalo.







## RESUMEN

Actualmente, una de las principales preocupaciones de las autoridades sanitarias y de la industria alimentaria sigue siendo garantizar la inocuidad microbiológica en la cadena alimentaria ya que a pesar de los notables esfuerzos realizados, el número de brotes y casos de enfermedades de transmisión alimentaria causadas por microorganismos sigue elevándose. Por otro lado, otro de los problemas que debe afrontar la industria alimentaria es la implementación de nuevas alternativas de producción más sostenibles, manteniendo altos estándares de seguridad y garantizando la disponibilidad de alimentos. En este contexto se enmarca la presente tesis doctoral, cuyo principal objetivo es la evaluación *in vivo* e *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de distintas sustancias naturales procedentes de fuentes alternativas, más sostenibles (extracto de coliflor, espirulina y soluciones de quitosano), frente a microorganismos patógenos de importancia en la industria de alimentos.

Los estudios demuestran la capacidad antimicrobiana *in vitro* del quitosano de insecto y crustáceo frente a microorganismos patógenos como *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* siendo dependiente del pH del medio estudiado. Además, cuando el quitosano se combina con un tratamiento suave de altas presiones hidrostáticas, se pone de manifiesto una relación sinérgica entre ambas tecnologías llegando a inactivar completamente la carga microbiana de *S. Typhimurium*.

Los estudios *in vivo* llevados a cabo con *Caenorhabditis elegans* muestran que el nematodo aumenta su supervivencia en presencia de extractos de coliflor y espirulina. En cuanto a la capacidad antimicrobiana, los extractos de espirulina

y de coliflor reducen la colonización intestinal por *S. Typhimurium* en el nematodo mostrando así su capacidad antimicrobiana *in vivo*.

En la presente tesis doctoral, se hace un recorrido completo sobre la capacidad antimicrobiana de ciertos extractos vegetales o componentes procedentes de animales, fundamentalmente basados en estudios *in vivo*. Este es un paso importante en la materialización de estos compuestos como alternativas más naturales y sostenibles a otros compuestos sintéticos usados en conservación de alimentos.

## RESUM

Actualment, una de les principals preocupacions de les autoritats sanitàries i de la indústria alimentària continua sent garantir la innocuïtat microbiològica en la cadena alimentària ja que malgrat els notables esforços realitzats, el nombre de brots i casos de malalties de transmissió alimentària causades per microorganismes continua elevantse. D'altra banda, un altre dels problemes que ha d'afrontar la indústria alimentària és la implementació de noves alternatives de producció més sostenibles, mantenint alts estàndards de seguretat i garantint la disponibilitat d'aliments. En aquest context s'emmarca la present tesi doctoral, el principal objectiu de la qual és l'avaluació *in vivo* i *in vitro* de la capacitat antimicrobiana de diferents substàncies naturals procedents de fonts alternatives, més sostenibles (extracte de coliflor, espirulina i solucions de quitosano), enfront de microorganismes patògens d'importància en la indústria d'aliments.

Els estudis demostren la capacitat antimicrobiana *in vitro* del quitosano d'insecte i crustaci enfront de microorganismes patògens com a *E. coli*, *L. monocytogenes* i *S. Typhimurium* sent dependent del pH del mig estudiat. A més, quan el quitosano es combina amb un tractament suau d'altres pressions hidroestàtiques, es posa de manifest una relació sinèrgica entre totes dues tecnologies arribant a inactivar completament la càrrega microbiana de *S. Typhimurium*.

Els estudis *in vivo* duts a terme amb *Caenorhabditis elegans* mostren que el nematode augmenta la seua supervivència en presència d'extractes de coliflor i espirulina. Quant a la capacitat antimicrobiana, els extractes d'espirulina i de coliflor redueixen la colonització intestinal per *S. Typhimurium* en el nematode mostrant així la seua capacitat antimicrobiana *in vivo*.

En la present tesi doctoral, es fa un recorregut complet sobre la capacitat antimicrobiana d'uns certs extractes vegetals o components procedents d'animals, fonamentalment basats en estudis *in vivo*. Aquest és un pas important en la materialització d'aquests compostos com a alternatives més naturals i sostenibles a altres compostos sintètics usats en conservació d'aliments.

## SUMMARY

Currently, one of the main concerns of the health authorities and the food industry continues to be ensuring microbiological safety in the food chain, as despite considerable efforts, the number of outbreaks and cases of foodborne diseases caused by microorganisms continues to rise. On the other hand, another challenge facing the food industry is the implementation of new, more sustainable production alternatives while maintaining high safety standards and ensuring food availability. It is in this context, the main objective of this PhD thesis is the *in vivo* and *in vitro* evaluation of the antimicrobial capacity of different natural substances from alternative, more sustainable sources (cauliflower extract, spirulina and chitosan solutions) against pathogenic microorganisms of importance in the food industry.

Studies demonstrate the *in vitro* antimicrobial capacity of insect and crustacean chitosan against pathogenic microorganisms such as *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium*, being dependent on the pH of the medium studied. Moreover, when chitosan is combined with a mild treatment of high hydrostatic pressures, a synergistic relationship between both technologies is evident, reaching the point of completely inactivating the microbial load of *S. Typhimurium*.

*In vivo* studies carried out with *Caenorhabditis elegans* show that the nematode increases its survival in the presence of cauliflower and spirulina extracts. In terms of antimicrobial capacity, spirulina and cauliflower extracts reduce intestinal colonization by *S. Typhimurium* in the nematode, thus showing their antimicrobial capacity *in vivo*.

In this doctoral thesis, a complete overview of the antimicrobial capacity of

certain plant extracts or animal-derived compounds is presented, mainly based on *in vivo* studies. This is an important step in the materialisation of these compounds as more natural and sustainable alternatives to other synthetic compounds used in food preservation.







## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL TEMA .....</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>9</b>
<b>II.1</b>	<b>Importancia de la inocuidad alimentaria. Patógenos alimentarios .....</b>	<b>9</b>
<b>II.2</b>	<b>Agroindustria, impacto medioambiental y economía circular .....</b>	<b>14</b>
<b>II.3</b>	<b>Sustancias naturales antimicrobianas.....</b>	<b>20</b>
II.3.1	Antimicrobianos naturales procedentes de vegetales.....	22
II.3.1.1	Potencial antimicrobiano de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (coliflor).....	26
II.3.2	Antimicrobianos naturales procedentes de animales .....	28
II.3.2.1	Acción antimicrobiana del quitosano.....	31
II.3.3	Antimicrobianos naturales procedentes de cianobacterias	35
II.3.3.1	Acción antimicrobiana de <i>Arthrospira</i> spp. ( <i>Spirulina</i> spp.) .....	37
<b>II.4</b>	<b>Métodos para determinar la capacidad antimicrobiana .....</b>	<b>39</b>
II.4.1	<i>In vitro</i> .....	39
II.4.2	<i>In vivo</i> .....	42
<b>II.5</b>	<b>Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>) como organismo modelo.....</b>	<b>44</b>
II.5.1	Fisiología y ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	45
<b>II.6</b>	<b>Aplicación de la Alta Presión Hidrostática (HHP) en el campo alimentario: tecnología de barreras.....</b>	<b>48</b>

---

<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>IV. PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>61</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
<b>V.1 Preparación de las sustancias naturales del estudio .....</b>	<b>69</b>
<b>V.2 Protocolos de reactivación y crecimiento de cepas micro- bianas .....</b>	<b>70</b>
<b>V.3 Técnicas generales de manipulación de <i>C. elegans</i> .....</b>	<b>71</b>
V.3.1 Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i> en medio Nematode Growth Media (NGM).....	71
V.3.2 Preparación de cultivo bacteriano como alimento de <i>C. elegans</i> en placa .....	72
V.3.3 Sincronización de <i>C. elegans</i> .....	73
V.3.4 Estudios de supervivencia y esperanza de vida.....	73
V.3.5 Estudios de puesta de huevos.....	74
<b>V.4 Materiales y métodos para determinar la capacidad anti- microbiana <i>in vivo</i>.....</b>	<b>74</b>
V.4.1 Evaluación del efecto de las sustancias naturales sobre <i>C. elegans</i> .....	75
V.4.1.1 Preparación de medio NGM con las diferentes sustancias naturales .....	75
V.4.1.2 Grupos de estudio.....	76
V.4.2 Determinación de la capacidad antimicrobiana <i>in vivo</i> ...	77
V.4.2.1 Estudios de supervivencia y esperanza de vida para determinar la capacidad antimicrobiana.....	77
V.4.2.2 Estudios de lisis de <i>C. elegans</i> para determinar la capacidad antimicrobiana .....	78
<b>V.5 Materiales y métodos para determinar la capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i>.....</b>	<b>82</b>
V.5.1 Preparación de solución de quitosano de crustáceo y de insecto .....	82

---

V.5.2	Evaluación de la capacidad antimicrobiana <i>in vitro</i> de una solución de quitosano de crustáceo y de insecto frente a <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i> ...	83
V.5.3	Evaluación del efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> de quitosano combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a <i>S. Typhimurium</i> .....	84
V.5.4	Evaluación del daño celular .....	84
<b>V.6</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>86</b>
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
<b>VI.1.</b>	<b>Capítulo 1: Efecto de extractos de coliflor, espirulina y soluciones de quitosano sobre <i>C. elegans</i>.....</b>	<b>95</b>
VI.1.1	Introducción .....	95
VI.1.2	Resultados y discusión .....	97
VI.1.2.1	Efecto de extracto de coliflor al 3% (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida, y pauta de puesta de huevos de <i>C. elegans</i> .....	97
VI.1.2.2	Efecto de soluciones de quitosano de crustáceo e insecto al 0,15 % (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida y pauta de puesta de huevos de <i>C. elegans</i> . 105	
VI.1.2.3	Efecto de soluciones de espirulina al 0,1 % (p/v) en la esperanza de vida, supervivencia y puesta de huevos de <i>C. elegans</i> .....	116
VI.1.3	Conclusiones.....	124
<b>VI.2</b>	<b>Capítulo 2: Efecto antimicrobiano de quitosano frente a <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium in vitro</i> .....</b>	<b>127</b>
VI.2.1	Introducción .....	127
VI.2.2	Resultados y discusión .....	129
VI.2.3	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>E. coli</i> .....	129
VI.2.3.1	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>L. monocytogenes</i> .....	131

VI.2.3.2	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a <i>S. Typhimurium</i> .....	134
VI.2.3.3	Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano en <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. Typhimurium</i> tras 8 horas de incubación.....	136
VI.2.4	Conclusiones.....	142
<b>VI.3</b>	<b>Capítulo 3: Efecto antimicrobiano de quitosano <i>in vitro</i> combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a <i>S. Typhimurium</i>.....</b>	<b>145</b>
VI.3.1	Introducción.....	145
VI.3.2	Resultados y discusión.....	147
VI.3.2.1	Efecto del quitosano de crustáceo y de insecto frente a <i>S. Typhimurium</i> .....	147
VI.3.2.2	Efecto de alta presión hidrostática (HHP) sobre <i>S. Typhimurium</i> .....	147
VI.3.2.3	Efecto combinado del quitosano y alta presión hidrostática (HHP) sobre <i>S. Typhimurium</i> .....	150
VI.3.2.4	Evaluación de la población celular dañada expuesta a quitosano y/o tratamientos de alta presión hidrostática (HHP).....	154
VI.3.3	Conclusiones.....	158
<b>VI.4</b>	<b>Capítulo 4: Efecto antimicrobiano de espirulina frente a <i>S. Typhimurium in vivo</i>.....</b>	<b>163</b>
VI.4.1	Introducción.....	163
VI.4.2	Resultados y discusión.....	165
VI.4.2.1	Efecto del extracto de espirulina sobre la supervivencia y esperanza de vida de <i>C. elegans</i> infectados .....	165
VI.4.2.2	Efecto del extracto de espirulina en <i>S. Typhimurim</i> en el tracto digestivo de <i>C. elegans</i> .....	172
VI.4.3	Conclusiones.....	174

---

<b>VI.5 Capítulo 5: Efecto antimicrobiano de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (coliflor) frente a <i>S. Typhimurium in vivo</i> .....</b>	<b>177</b>
VI.5.1 Introducción .....	177
VI.5.2 Resultados y discusión .....	179
VI.5.2.1 Efecto del extracto de coliflor sobre la supervivencia y esperanza de vida de <i>C.elegans</i> infectados .....	179
VI.5.2.2 Efecto del extracto de coliflor en <i>S. Typhimurim</i> en el tracto digestivo de <i>C. elegans</i> .....	186
VI.5.3 Conclusiones .....	188
<b>VII. DISCUSIÓN .....</b>	<b>195</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>205</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>213</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>249</b>



---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura II.1.</b> Pared celular bacteriana: Gram negativa (imagen a la izquierda) y Gram positiva (imagen a la derecha) (Chaudhuri y Chaudhuri, 2018).....	26
<b>Figura II.2.</b> Estructura de quitina (imagen superior) y quitosano (imagen inferior).....	29
<b>Figura II.3.</b> Tricomas de <i>Arthrospira platensis</i> (Borowitzka, 2018; Karali, F., 2011) .....	37
<b>Figura II.4.</b> Anatomía de <i>C. elegans</i> adulto hermafrodita obtenida por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Altun y Hall, 2009). Imágenes modificadas .....	45
<b>Figura II.5.</b> Sexos de <i>C. elegans</i> : hermafrodita (XX) y macho (XO) .....	46
<b>Figura II.6.</b> Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 20 °C (modificado de Altun y Hall, 2009; Byerly et al., 1976).....	47
<b>Figura V.1.</b> Procedimiento de obtención de lisis de <i>C. elegans</i> .....	81
<b>Figura VI.1.1.</b> Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> para las dos poblaciones consideradas en el estudio con extracto de coliflor .....	98
<b>Figura VI.1.2.</b> Funciones estimadas de supervivencia de las poblaciones del estudio con extracto de coliflor .....	99
<b>Figura VI.1.3.</b> Funciones estimadas de riesgo acumulado de las distintas poblaciones del estudio con extracto de coliflor.....	102

---

<b>Figura VI.1.4.</b> Promedio de puesta de huevos de <i>C. elegans</i> alimentados sin y con extracto de coliflor .....	104
<b>Figura VI.1.5.</b> Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con quitosano.....	106
<b>Figura VI.1.6.</b> Funciones estimadas de supervivencia para las distintas poblaciones del estudio con quitosano .....	108
<b>Figura VI.1.7.</b> Funciones estimadas de riesgo acumulado de las poblaciones del estudio con quitosano .....	111
<b>Figura VI.1.8.</b> Promedio de la puesta de huevos de <i>C. elegans</i> en diferentes sustratos del estudio con quitosano .....	112
<b>Figura VI.1.9.</b> Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con extracto de espirulina.....	117
<b>Figura VI.1.10.</b> Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio con extracto de espirulina .....	118
<b>Figura VI.1.11.</b> Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio con extracto de espirulina .....	121
<b>Figura VI.1.12.</b> Número promedio de huevos por gusano a lo largo de su vida en el estudio con espirulina .....	122
<b>Figuras VI.2.1.</b> Evolución de <i>E. coli</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de $10^3$ UFC/mL (A) y $10^6$ UFC/mL (B) .....	130
<b>Figuras VI.2.2.</b> Evolución de <i>L. monocytogenes</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de $10^3$ UFC/mL (A) y $10^6$ UFC/mL (B) .....	133



---

<b>Figuras VI.2.3.</b> Evolución de <i>S. Typhimurium</i> en diferentes sustratos con una contaminación inicial de $10^3$ UFC/mL (A) y $10^6$ UFC/mL (B) .....	135
<b>Figuras VI.3.1.</b> Curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en medio control (A) y control ácido (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa(2 minutos), y a 450 MPa (2 minutos), durante 49 horas de incubación a 37 °C.....	149
<b>Figuras VI.3.2.</b> Curvas de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> en medio con quitosano de crustáceo (A) y medio con quitosano de insecto (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa y a 450 MPa durante 49 horas de incubación a 37°C.....	151
<b>Figuras VI.3.3.</b> Concentración de células dañadas de <i>S. Typhimurium</i> expuestas a 0,15% de quitosano de crustáceo (A) y quitosano de insecto (B) sin tratamiento de altas presiones.....	155
<b>Figura VI.3.4.</b> Análisis de células dañadas de <i>S. Typhimurium</i> tratadas a 300 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C.....	156
<b>Figura VI.3.5.</b> Análisis de la población de <i>S. Typhimurium</i> tratada a 450 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C.....	157
<b>Figura VI.4.1.</b> Curvas de supervivencia para <i>C. elegans</i> con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina .....	165
<b>Figura VI.4.2.</b> Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina.....	167

---

<b>Figura VI.4.3.</b> Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de espirulina.....	170
<b>Figura VI.4.4.</b> Evolución de la carga microbiana en el intestino del nematodo alimentado (barra gris) y no alimentado (barra blanca) con espirulina a las 48 horas post-infección.....	173
<b>Figura VI.5.1.</b> Curvas de supervivencia de <i>C. elegans</i> con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor .....	180
<b>Figura VI.5.2.</b> Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor ..	182
<b>Figura VI.5.3.</b> Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con <i>S. Typhimurium</i> tratada con extracto de coliflor .....	185
<b>Figura VI.5.4.</b> Evolución de la carga microbiana de <i>Salmonella</i> en el intestino de <i>C. elegans</i> a las 24, 48 y 96 horas post-infección alimentados con extracto de coliflor (barras rayadas) y sin extracto de coliflor (barras blancas).....	187

---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla II.1.</b> Fuentes de quitina y quitosano (Zargar et al., 2015).....	29
<b>Tabla V.1.</b> Grupos de estudio empleados en la evaluación del efecto de sustancias naturales sobre <i>C. elegans</i> en función del tipo de medio con el que fueron alimentados .....	77
<b>Tabla V.2.</b> Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de los cambios en la supervivencia de <i>C. elegans</i> .....	77
<b>Tabla V.3.</b> Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de la lisis de <i>C. elegans</i> .....	78
<b>Tabla VI.1.1.</b> Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor .....	100
<b>Tabla VI.1.2.</b> Prueba t-student realizada para los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor .....	101
<b>Tabla VI.1.3.</b> Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con quitosano.....	109
<b>Tabla VI.1.4.</b> ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles 75, 50 y 25 para la distribución de supervivencia de <i>C.elegans</i> en distintos medios de alimentación del estudio con quitosano.....	110
<b>Tabla VI.1.5.</b> Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con espirulina.....	119

---

<b>Tabla VI.1.6.</b> Prueba t-student para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> en los diferentes medios de alimentación del estudio con espirulina .....	120
<b>Tabla VI.2.1.</b> Comportamiento de <i>E. coli</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos .....	137
<b>Tabla VI.2.2.</b> Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos.....	138
<b>Tabla VI.2.3.</b> Comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos.....	139
<b>Tabla VI.3.1.</b> Inactivación de <i>S. Typhimurium</i> como consecuencia del tratamiento por HHP, expresado como $\log_{10} (N_i/N_0) \pm$ desviación estándar en las diferentes matrices estudiadas .....	148
<b>Tabla VI.4.1.</b> Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina .....	168
<b>Tabla VI.4.2.</b> ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C. elegans</i> en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina.....	169
<b>Tabla VI.5.1.</b> Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor .....	183
<b>Tabla VI.5.2.</b> ANOVA y test post- hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de <i>C.elegans</i> en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor.....	184

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**µg/mL:** microgramo/mililitro

**µg:** microgramo

**µm:** micrómetro

**µM:** micromolar

**AC:** control ácido

**ADEC:** *E. coli* de adherencia difusa

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AECOSAN:** Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

**ANOVA:** análisis de la varianza

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Adenosín trifosfato

**a<sub>w</sub>:** actividad de agua

**C:** controles sin ácido acético

**CaCl<sub>2</sub>:** cloruro cálcico

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)

**cm:** centímetro

**CMB:** concentración mínima bactericida

**CMI:** concentración mínima inhibitoria

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DO:** densidad óptica

**EAEC:** *E. coli* enteroagregativa

**EC:** *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

**EC-AC:** Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con ácido acético

**EC-AC-QC:** Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de crustáceo al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

**EC-AC-QI:** Nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de insecto al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

**EC-CL:** *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) alimentados con *E. coli* OP50

**ECDC:** European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)

**EC-SP:** *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) y alimentados con *E. coli* OP50

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EFSA:** European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

**EHEC o VTEC o STEC:** *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica o productor de toxina Shiga

**EIEC:** *E. coli* enteroinvasiva

**EMB:** Eosina azul de metileno

**EPEC:** *E. coli* enteropatogénica

**ETEC:** *E. coli* enterotoxigénica

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

**FDA:** U.S. Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos)

**g:** gramo

**GFP:** proteína verde fluorescente

**GRAS:** Generalmente Reconocido como Seguro

**h:** hora

**HHP:** altas presiones hidrostáticas

**HMWC:** Quitosano de alto peso molecular

**HSD de Tukey:** test de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey

**kDa:** kilodalton

**LB:** Luria Bertani

**LBA:** agar de Luria Bertani

**LMWC:** Quitosano de bajo peso molecular

**log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>):** cociente de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) entre el valor de la concentración inicial (t = 0 h) (N<sub>0</sub>)

**LPS:** lipopolisacárido

**L-ST:** *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con *E. coli* OP50

**L-ST-CL:** *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con infusión de coliflor al 3% (p/v) y *E. coli* OP50

**L-ST-SP:** *C. elegans* infectados con *Salmonella* Typhimurium durante 24 horas en medio NGM y traspasados a medio NGM con extracto de espirulina y *E. coli* OP50

**M:** molar

**mg/mL:** miligramo/mililitro

**MgSO<sub>4</sub>:** sulfato de magnesio

**min:** minuto

**mL:** mililitro

**MPa:** megapascales

**NGM:** medio de crecimiento de nematodos

**NK:** células natural killer

**O<sub>2</sub>:** oxígeno

**°C:** grados centígrados

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**p/v:** partes por volumen

**PEF:** pulsos eléctricos de alto voltaje

**pH:** potencial hidrógeno

**pKa:** logaritmo negativo en base 10 de la constante de disociación ácida (Ka)

**ppm:** partes por millón

**PVDF:** fluoruro de polivinilideno

**QC:** quitosano de crustáceo

**QI:** quitosano de insecto

**REDOX:** oxidación-reducción u óxido-reducción

**rpm:** revoluciones por minuto

**S.L.:** Sociedad Limitada

**SS:** Sulfato de sodio

**ST:** *C. elegans* en medio NGM infectados con *Salmonella* Typhimurium

**ST-CL:** *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v)  
infectados con *Salmonella* Typhimurium

**ST-SP:** *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v)  
infectados con *Salmonella* Typhimurium

**t:** tiempo

**t<sub>0</sub>:** tiempo a 0 horas

**TPP:** Tripolifosfato de sodio

**TSA:** agar triptona- soja

**TSB:** caldo de triptona de soja

**UE:** Unión Europea

**UFC/gusano:** unidades formadoras de colonia/gusano

**UFC/mL:** unidades formadoras de colonias/mL

**UV:** ultravioleta

**v/v:** volumen/volumen

**var.:** variedad







# *JUSTIFICACIÓN*

---



## I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

Actualmente existe una gran preocupación por el impacto que los procesos industriales tienen sobre el medio ambiente. La industria agroalimentaria no escapa de esta preocupación, donde parte de los residuos generados se vierten al medioambiente perjudicando tanto al ecosistema como a la economía de la empresa desaprovechando su potencial valor residual (fuente de nutrientes y compuestos bioactivos) como subproductos, además del coste que le supone pagar las penalizaciones impuestas por las autoridades medioambientales.

De los residuos de la agricultura y procesado de algunas plantas como coliflor, brócoli y cítricos es posible obtener extractos naturales con una cierta capacidad bioactiva, los cuales pueden resultar interesantes desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, pues algunos de ellos han demostrado que tienen capacidad antimicrobiana y pueden ser muy efectivos frente a patógenos alimentarios como *Salmonella* ó *E. coli* tanto a nivel individual como combinado con otras tecnologías de conservación como el procesado por altas presiones (HHP) o pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF). Otra fuente interesante de productos bioactivos son las sustancias extraídas de subproductos del descarte pesquero (crustáceos) o de insectos, como la quitina, de donde se extrae el quitosano, cuyas propiedades de no toxicidad a bajas concentraciones, biodegradabilidad, baja alergenicidad y capacidad antimicrobiana contribuyen a su interés dentro de la industria agroalimentaria y farmacéutica. Por otro lado, los extractos de cianobacterias como *Spirulina* spp. se han usado para el consumo humano desde hace algún tiempo por su alto contenido en macro y micronutrientes y de ahí su uso como suplemento nutricional o ingrediente en alimentación (colorante, preparación de alimentos fermentados, entre otros). Además, *Spirulina* spp. poseen potencial para producir sustancias antimicrobianas.

La implementación de nuevas alternativas de producción más sostenibles manteniendo altos estándares de seguridad y garantizando la disponibilidad de alimentos es uno de los principales retos de la industria alimentaria. En este sentido, es interesante estudiar y caracterizar la potencial actividad antimicrobiana que poseen matrices alimentarias de fuentes más sostenibles. Aunque la primera aproximación para estudiar la capacidad antimicrobiana de los agentes químicos naturales o sintéticos son los estudios *in vitro*, es necesario tener una aproximación *in vivo*, ya que la efectividad de los antimicrobianos se puede ver afectada por las características particulares de un alimento o del tracto digestivo de los seres vivos.

En consecuencia, se plantea la siguiente tesis doctoral cuyo principal objetivo es la evaluación *in vivo* e *in vitro* de la capacidad antimicrobiana de distintas sustancias naturales procedentes de fuentes alternativas, más sostenibles (extracto de coliflor, espirulina y soluciones de quitosano), frente a microorganismos patógenos de importancia en la industria de alimentos.

La perspectiva industrial de los resultados de esta tesis puede ser más que interesante redundando en beneficios económicos como consecuencia de la mitigación de pérdidas por problemas de inocuidad alimentaria.







# ***ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS***

---



## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### II.1 Importancia de la inocuidad alimentaria. Patógenos alimentarios

Una de las principales preocupaciones de las autoridades sanitarias y de la industria alimentaria es la inocuidad microbiológica de los alimentos producidos y que se encuentran actualmente en el mercado o que están en fase de desarrollo para su posterior venta y distribución. A pesar de los notables esfuerzos realizados para mitigar la incidencia de las enfermedades de origen alimentario, el número de brotes y casos esporádicos de estas enfermedades causadas por microorganismos sigue siendo elevado según la European Food Safety Authority (EFSA, 2017).

Según informes de la EFSA y del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2019), la salmonelosis es la enfermedad alimentaria más frecuente después de la campilobacteriosis (246.571), con un registro en los estados miembros de la Unión Europea (UE) de 91.857 casos y 8.730 detectados en España. En los últimos años la incidencia se mantiene constante dentro de la UE (periodo 2014-2018) (EFSA y ECDC, 2019).

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está formado por dos especies, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*). A su vez, la especie principal, *S. enterica*, está compuesta por seis subespecies y más de 2.500 serovares (Grimont y Weill, 2007). *Salmonella* spp. son bacilos Gram negativos intracelulares anaerobios facultativos, no esporulados y con flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum* y *S. pullorum*). Crece entre 7 y 48 °C, con una temperatura óptima entre 35 y 37 °C, pH entre 4 y 8, y actividad de agua ( $a_w$ ) entre 0,94 y 0,99, aunque

persiste a  $a_w < 0,94$ , resistiendo además condiciones de deshidratación, pero incapaces de sobrevivir por encima de 70 °C.

Exceptuando *S. typhi* y *S. paratyphi*, cuyo reservorio único es el ser humano, los reservorios de *Salmonella* spp. son los intestinos de animales (salvajes y domésticos) como las aves de corral, ganado porcino y bovino, reptiles, perros y gatos que, siendo incluso asintomáticos, pueden infectar al hombre. Menos frecuentes pero posibles son los reservorios humanos infectados. Existen reservorios inanimados (suelo, aguas de pozos, carcasas de animales y productos con elevadas cargas de proteína y grasas) donde puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo (Uribe y Suárez, 2006). Esta zoonosis se transmite de animales a humanos, y viceversa, de forma directa o indirecta, es decir, a través de la ingesta de *Salmonella* presente en agua y/o alimentos derivados de animales infectados o contaminados con heces humanas o de animales infectados, o bien por alimentos no contaminados inicialmente pero que sufran contaminaciones cruzadas con productos de origen animal contaminados. La manipulación de alimentos sin la higiene personal adecuada, la utilización de utensilios contaminados en industrias alimentarias y cocinas, y la vía fecal-oral persona-persona y animal-persona, son también vectores por los que el microorganismo puede llegar al ser humano y desencadenar la enfermedad. Cuando *Salmonella* se ingiere, fundamentalmente a través de los alimentos, coloniza el intestino delgado e invade ganglios linfáticos mesentéricos, dando lugar a la infección localizada. Al evadir las defensas intracelulares de las células intestinales, se divide en su interior, pasando a la sangre, y provocando una infección sistémica. Los síntomas asociados a la infección normalmente aparecen entre las 6 y 72 h tras la infección y pueden cursar con diarrea, náuseas, fiebre y calambres abdominales. Por el contrario, la bacteria puede encontrarse en el intestino de animales sin manifestación de la enfermedad y comportarse éstos como portadores sanos eliminando la

bacteria a través de las heces.

*Salmonella* puede estar presente en la carne de vacuno, porcino, aves de corral y productos cárnicos derivados, leche y productos lácteos, así como huevos y ovoproductos. Considerando el total de alimentos muestreados a los que se atribuyeron los brotes de salmonelosis en 2018, el mayor porcentaje de los brotes (45,6%) se debió al consumo de huevos y ovoproductos. De entre los casos de personas infectadas por *S. Typhimurium* asociados al consumo de carne animal, un 43,6% se debió al consumo de pollo, 27,3% de cerdo, 13,9% de aves ponedoras, 13,1% de pavo y 2,3% de ganado. Se ha indicado que de todas las etapas de muestreo, el matadero y las plantas procesadoras fueron los principales lugares con mayor número de positivos encontrados en carne y productos cárnicos (EFSA y ECDC, 2019).

*Salmonella* no es el único patógeno que preocupa a las autoridades sanitarias. En los últimos años está tomando gran relevancia *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), no exactamente por el número de brotes, sino por su virulencia y porcentaje de fallecimientos asociados a la infección y las secuelas, afectando en gran medida a poblaciones de riesgo. *L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo anaerobio intracelular facultativo no esporulado capaz de fagocitar células del sistema fagocítico mononuclear y replicarse en su interior. Su movilidad es posible a temperaturas iguales o menores de 30 °C (inmóvil a 37 °C) a través de flagelos peritricos y es capaz de multiplicarse entre 3 y 45 °C (temperatura óptima entre 30 y 37 °C) en un rango de pH entre 4,4 y 9,6, tolerando la congelación (-18 °C), ambientes salinos y con posibilidad de formar biofilms. No puede crecer a una actividad de agua ( $a_w$ ) inferior a 0,9, pero sí sobrevivir a niveles más bajos (Acha y Szyfres, 2001; Bover i Cid y Garriga i Turón, 2014; Hudson, 1992).

De entre los reservorios de *L. monocytogenes* destacan los mamíferos salvajes o domésticos, aves de corral, agua, suelo, forraje y humanos infectados. Se puede transmitir a través de alimentos contaminados, contaminaciones cruzadas, vía fecal-oral, vía transplacentaria o a través del canal del parto, por contacto con material contaminado, existiendo también casos nosocomiales y portadores asintomáticos. La incubación dura de 3 a 70 días, y los síntomas que pueden aparecer son meningoencefalitis, septicemia en neonatos y adultos, fiebre, endocarditis, abscesos externos e internos, endoftalmitis y abortos en embarazadas.

Los alimentos susceptibles de contaminación por *L. monocytogenes* pueden ser crudos o procesados (como ahumados, embutidos cocidos y crudos curados), de origen animal (carne y productos cárnicos listos para el consumo, pescado y productos derivados listos para el consumo, quesos y productos lácteos sin pasteurizar) o vegetal. En 2018, los vegetales, zumos y productos derivados contribuyeron con el mayor porcentaje de casos positivos (28,6%) al total de brotes en alimentos originados por *Listeria*. Respecto al estudio de la presencia en animales (en 12 países miembros y 2 externos a la UE), el 2% de los animales fueron positivos para *Listeria* spp., y concretamente, el 61,7% de los animales estaban infectados por *L. monocytogenes* (EFSA y ECDC, 2019).

Este patógeno alimentario provocó 2.549 casos confirmados de listeriosis en humanos en los Estados Miembros de la UE durante 2018. A diferencia de *Salmonella*, existe una tendencia creciente de casos por *Listeria* acumulando un 15,6% de letalidad en 2018, siendo responsable del mayor número de hospitalizaciones de entre las zoonosis bajo vigilancia en la UE. Además, se considera de especial vigilancia por su transmisión vía transplacentaria o a través del canal del parto. Como dato reciente a destacar, España registró el mayor brote nacional de listeriosis por consumo de carne mechada afectando

a más de 200 personas en el año 2019 (Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud y Familias, 2019).

Otro patógeno de origen alimentario, *Escherichia coli* (*E. coli*) productor de toxina Shiga también está generando problemas de enfermedad transmitida por alimentos en todo el mundo. Es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, no esporulado, que puede crecer entre 7-50 °C (temperatura óptima entre 35-40 °C, se inactiva a temperaturas superiores a 70 °C), con pH óptimo entre 6 y 7, pero sensible a pH < 3,8 ó > 9,5, mostrando tolerancia a condiciones ácidas, y con una  $a_w$  mínima de 0,95. Las distintas cepas patogénicas intestinales de *E. coli* se clasifican en función del factor genético al que se le atribuye su virulencia: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (ADEC) y *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica o productor de toxina Shiga (EHEC ó VTEC ó STEC), dentro del cual se encuentra el serotipo *Escherichia coli* O157:H7. También existen *E. coli* comensales y otras patógenas extraintestinales.

Respecto a *E. coli* productor de toxina Shiga, *E. coli* O157:H7, los reservorios principales son rumiantes, aunque se ha detectado también en otros mamíferos (conejos, cerdos, caballos, perros y gatos) y aves. La transmisión es parecida a la descrita por *Salmonella*, y el tiempo de incubación varía entre 3 y 8 días, pudiendo dar lugar a síntomas como calambres abdominales, diarrea, en ocasiones con sangre, fiebre, vómitos, síndrome hemolítico urémico, el cual es potencialmente mortal, y a veces complicaciones neurológicas.

*E. coli* productor de toxina Shiga se puede encontrar en productos animales u hortícolas, naturales o elaborados de manera inadecuada, semillas germinadas, productos lácteos no pasteurizados, así como en agua. En 2018, un 2,4% de

los alimentos muestreados estaban contaminados. Por otro lado, los casos en animales parecen estar disminuyendo respecto a períodos anteriores, mientras que en humanos, se registraron 8.161 infecciones humanas en Estados Miembros de la UE incrementándose un 39% respecto a 2017, de las cuales 126 infecciones ocurrieron en España (EFSA y ECDC, 2019).

En resumen, las infecciones alimentarias dan lugar a 600 millones de personas enfermas y 420.000 muertes anuales en todos los rangos de edad, poniendo en riesgo no sólo la salud poblacional y la confianza del consumidor en el producto, sino afectando, además, el sector sanitario y el desarrollo económico, comercial y turístico según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019). Por consiguiente, se sigue trabajando a nivel internacional, tanto en los organismos de salud pública como en la industria, en el desarrollo de estrategias para prevención, detección y reducción de patógenos alimentarios desde la granja con el objetivo de reducir los casos de infección a lo largo de la cadena alimentaria y proporcionar un producto seguro a los consumidores (OMS, 2019).

## **II.2 Agroindustria, impacto medioambiental y economía circular**

Se ha reconocido que las prácticas agroindustriales actuales sobre todo en los países desarrollados, producen un desaprovechamiento de alimentos a la vez que se genera una gran cantidad de residuos que impactan negativamente en el medio ambiente, además de ser socialmente cuestionable. Esto lleva a que en las sociedades industrializadas y con recursos, haya una corriente cada vez mayor hacia el aprovechamiento de esos desperdicios dándole un segundo uso. Se define como pérdida de alimento a “la disminución de alimentos comestibles a nivel de producción, post-cosecha, procesamiento y distribución”, y desperdicio (residuo alimentario) a “aquellos alimentos



desechados a pesar de ser aptos para el consumo” según la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2011). En 2010, la UE informó de pérdidas y desperdicios anuales de unos 89 millones de toneladas de alimentos de los cuales 7,7 millones de toneladas (175,9 kg/año per cápita) se generaron en España, siendo el séptimo país que produjo mayor cantidad de desperdicio de alimentos (Comisión Europea y Servicio de BIO Inteligencia, 2010). Por otra parte, las proyecciones sobre población mundial apuntan a que hacia el año 2.050 haya una población mundial de hasta 9.800 millones de personas, lo cual supondría la necesidad de aumentar en un 70% los recursos alimentarios (fundamentalmente proteínas provenientes de diferentes fuentes), lo que podría implicar un posible agotamiento de recursos como agua, intensificación de la producción agrícola, aumento de la deforestación y limitación de espacio disponible para la explotación ganadera (FAO, 2011; Huis y Oonincx, 2017). En consecuencia, es urgente tomar medidas preventivas y, en este sentido, los países integrantes de la UE se plantearon como objetivo para 2025 reducir en un 30% los residuos alimentarios y apostar por la reutilización de subproductos de la agroindustria según European Commission (EC, 2014).

En lo que se refiere a la industria agrícola, tras la cosecha y en los puntos de transporte, almacenamiento y procesado de materia prima agrícola se generan una gran cantidad de residuos como hojas, semillas, piel, tallos y cáscaras, que, sin un tratamiento correcto, repercuten negativamente en el medioambiente con un impacto económico y social importante. Los residuos vertidos y no tratados pueden descomponerse y generar lixiviados contribuyendo a la eutrofización de mares, ríos y océanos y, además, liberar gases de efecto invernadero como metano y óxido nitroso (Pardo et al., 2015). Esto va ligado al gasto económico que la gestión de residuos supone para la industria. La apuesta por una valorización de los subproductos agrícolas generados durante la actividad

agroindustrial como fuentes potenciales de proteínas, lípidos, fibra y otros compuestos bioactivos, puede contribuir a que se entre de forma efectiva en una economía circular y residuo cero. Revertir la situación actual hacia una economía circular, beneficiaría no solo a la empresa generadora de residuos por la reducción de costes derivados del tratamiento de los mismos, sino a otras industrias que los incorporen como materia prima, como por ejemplo, la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria entre otras. Otra industria que podría beneficiarse de la reutilización de residuos es la de formulación de piensos para animales de granja o animales de compañía, la cual puede usar los subproductos como aditivo en los piensos dotándolos de determinadas propiedades beneficiosas para los animales y que en cierto sentido, podrían repercutir en un mayor nivel de inocuidad alimentaria. En este escenario general, la gran cantidad de subproductos generados en países con bajos recursos podrían ser una fuente potencial para el enriquecimiento de alimentos en la lucha contra la malnutrición (Torres-León et al., 2018).

Se ha visto que el consumo de vegetales del género *Brassica* aumenta cada año, y se estima que el consumo actual se duplicará con el aumento de población. Esta tendencia ha repercutido en que los últimos años se han financiado proyectos nacionales e internacionales en los que se han incentivado estudios sobre la valorización de los residuos agrícolas después de la recolección de este y otros vegetales. De entre los mayores productores de coliflor y brócoli destacan China (10,7 millones de toneladas anuales) e India (8,8 millones de toneladas anuales), representando alrededor del 73,7% de la producción donde España ocupa el quinto lugar (725.261 toneladas) con un 2,7% de la producción mundial (FAO, 2018). Los residuos de la coliflor suponen un 45-60% del peso total de la coliflor, siendo el 50% del mismo correspondiente a las hojas (Pankar y Bornare, 2018). Estos residuos son ricos en compuestos bioactivos aunque el contenido varía dependiendo del estado de crecimiento, del genotipo

de cultivo, del tejido específico de la planta y otros factores ambientales (Neugart et al., 2018). Las hojas de coliflor son una fuente potencial de fibra, micronutrientes como hierro, cobre, manganeso, zinc y  $\beta$ -caroteno, fitoquímicos como compuestos fenólicos e isotiocianatos con propiedades antimicrobianas y anticancerígenas respectivamente, y péptidos bioactivos con capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina que podría usarse para el tratamiento de la hipertensión (Caliceti et al., 2019). Los residuos de coliflor se pueden emplear también para alimentación animal y para la creación de alimentos funcionales (Aboufadel, 2012; Caliceti et al., 2019).

Otro residuo sobre el que se ha centrado el interés en los últimos años es el quitosano. El quitosano se obtiene de la desacetilación de la quitina presente en el exoesqueleto de invertebrados y hongos. El quitosano resulta interesante para la industria alimentaria, sobre todo en la faceta de productos bioactivos con determinadas propiedades beneficiosas para la salud. La explotación marisquera (Xu et al., 2013), los hongos crecidos en residuos orgánicos industriales (Cai et al., 2006; Chatterjee et al., 2008), así como el uso de insectos, generan cantidades importantes de residuos ricos en quitina. En este contexto, los insectos están recibiendo gran atención dadas las perspectivas mundiales de crecimiento de la población y del agotamiento de fuentes proteicas convencionales. Los insectos se consideran “nuevos alimentos”, siendo una gran fuente proteica y generando un bajo impacto medioambiental comparado con la explotación ganadera (Vantomme y Halloran, 2013), por lo que sus residuos podrían ser una buena alternativa para la obtención de quitosano. Actualmente, la principal fuente de quitina son los restos de crustáceos procedentes de la explotación marisquera, sin embargo, en un futuro se estima que haya escasez de quitina procedente de esta fuente dada la explotación marina. Las aplicaciones del quitosano no se restringen al ámbito alimentario, sino que son también de gran utilidad en ámbitos de

biomedicina y farmacia, cosmética, agricultura, tratamiento de aguas e industria textil (Kumirska et al., 2011; No y Meyers, 1995; Rinaudo, 2006; Shirvan et al., 2019).

Se ha estimado que aproximadamente se sintetizan alrededor de 100.000 millones de toneladas de quitina anualmente por crustáceos, moluscos, insectos y hongos (Tharanathan y Kittur, 2003). La explotación marisquera se encarga normalmente de quemar los residuos de mariscos, arrojarlos al mar o tierra o dejarlos hasta descomponerse con consecuencias medioambientales negativas y repercusión en la salud humana (Xu et al., 2013). Para hacernos una idea de la importancia del desaprovechamiento de los residuos generados, basta con mencionar que, por ejemplo, los residuos de langostinos representan del 50-70% del peso de la materia prima. La composición de los caparzones de crustáceos ofrece una fuente de componentes aún aprovechable con unos porcentajes generales de aproximadamente un 30-40% de proteína, 30-50% carbonato cálcico y fosfato cálcico y 20-30% quitina, aunque éstos puedan variar dependiendo de factores como especies, estación del año y condiciones de procesamiento (Gortari y Hours, 2013; Kumari y Rath, 2014).

Los insectos han sido tradicionalmente fuente de alimentación humana en países de Asia, África y América latina. A partir del 1 de julio de 2017, entró en vigor el Reglamento (UE) 2017/893, por el que quedaba regulada la incorporación de insectos en piensos para acuicultura, permitiéndose las siguientes especies: mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), mosca común (*Musca domestica*), gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*), grillo doméstico (*Acheta domesticus*), grillo rayado (*Grylloides sigillatus*) y grillo bicolor (*Gryllus assimilis*) (EC, 2017). Algunas de las ventajas medioambientales que presentan en comparación con el ganado son: menor cantidad de recursos necesarios para realizar sus

funciones vitales (menor necesidad de agua y tierra), elevada eficiencia en la conversión de alimento a proteína (necesitan menos alimento para aumentar su peso corporal) y producen menor emisión de gases de efecto invernadero. Además, aprovechan los restos biológicos (alimentos, humanos, estiércol) como fuente de alimentación que convierten en proteína de alta calidad (Vantomme y Halloran, 2013). Desde el punto de vista de la nutrición humana, aportan proteínas, lípidos, fibra, cobre, hierro, fósforo, manganeso, selenio y zinc en cantidades variables dependiendo de la especie, hábitat, alimentación y etapa de vida. La calidad de la proteína de especies como el grillo común (*Acheta domestica*) ha demostrado ser similar a la de la carne de pollo y pescado y mayor que la proteína del grano de soja (Bosch et al., 2014). Además, el consumo de insectos disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas (Vantomme y Halloran, 2013). No obstante, han sido catalogados como “nuevo alimento” según el reglamento (UE) 2015/2283 y algunos de ellos comercializados transitoriamente dentro de la UE (Bélgica, Austria, Finlandia, Dinamarca, Reino Unido y Holanda) a la espera de su autorización según la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN, 2018). Se conoce como “nuevo alimento” a aquel que no ha sido consumido de manera significativa antes de mayo de 1997. Así, la larva de *Tenebrio molitor* seca o en polvo ha sido el primer insecto autorizado para comercialización como “nuevo alimento” (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) et al., 2021). Las restantes solicitudes de autorización de insectos deberán ser evaluadas por EFSA en cuanto a su inocuidad aunque los insectos correspondientes se seguirán comercializando a la espera del resultado de dicha evaluación.

También se está intentando reducir el impacto ambiental de la producción y elaboración de alimentos, a través del cultivo y uso de materias primas alternativas a los animales o plantas. En este sentido, se está apostando

actualmente por el cultivo y comercialización de algas comestibles. La espirulina es un complemento alimenticio extraído de las cianobacterias *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima*, utilizadas tradicionalmente como alimento en tribus africanas. Respecto a la composición de la espirulina en polvo comercial, esta suele contener aproximadamente un 60% de proteína, 20% de hidratos de carbono, 5% de lípidos (de entre los cuales se incluyen ácidos grasos esenciales no saturados (1,3-1,5%)), 7% de vitaminas y minerales, y pigmentos fotosintéticos. Se le atribuye un alto valor nutricional, siendo capaz de superar la producción de proteína por unidad de superficie de la soja y el maíz, llegando incluso a una producción de proteína 200 veces mayor que la carne de vaca (Siva-Kiram et al., 2016).

*Arthrospira* puede emplearse en biorremediación medioambiental por su capacidad neutralizante o quelante al unirse a minerales tóxicos (Genene et al., 2016), para enriquecimiento del suelo (nitrógeno, fósforo y potasio), mejora del contenido proteico de plantas (Layam et al., 2016) y del crecimiento de cultivos (Osman et al., 2015). Algunas ventajas de la producción de *Spirulina* respecto a cultivos convencionales son su rápida tasa de crecimiento (20 días), menores requisitos de energía y agua por kilogramo y generación de mayor cantidad de oxígeno a partir de dióxido de carbono que los árboles (Siva-Kiram et al., 2016).

### **II.3 Sustancias naturales antimicrobianas**

Muchos de los subproductos de la industria agroalimentaria tienen sustancias con capacidad antimicrobiana y antioxidante, lo cual puede ser un incentivo para su revalorización, además de que posean otras propiedades relacionadas con productos farmacéuticos y aspectos nutricionales. La conservación de alimentos perecederos ha tenido especial importancia desde la antigüedad, así

como la búsqueda de sustancias o tecnologías para este fin. Los egipcios ya usaban productos naturales como las especias para conservar alimentos y en rituales fúnebres. A lo largo de la historia, además de usarse como aditivos alimentarios (potenciadores del sabor, colorantes y conservantes), se han empleado en medicina, cosmética y perfumería (Gottardi et al., 2016; Oiyee y Muroki, 2002). A partir de la revolución industrial a finales del siglo XIX, se impulsó una mayor y más rápida producción de alimentos, y en ese contexto los conservantes sintéticos se comenzaron a desarrollar y a usar por su inmediatez para ofrecer al consumidor un amplio abanico de alimentos con mayor vida útil e inocuos bajo el punto de vista microbiológico (Contento Salcedo, 1996). Así, la incorporación de antimicrobianos en la industria alimentaria tuvo como finalidad fundamental aumentar la durabilidad del alimento y ofrecer calidad y seguridad alimentaria al consumidor.

Algunos conservantes antimicrobianos artificiales como benzoato, propionato, sorbato sódico, nitratos, nitritos, y sulfitos se han relacionado con problemas de salud tras su consumo continuado y actualmente se rechazan por parte de los consumidores (Anand y Sati, 2013; Bondi et al., 2017; Sharma, 2015; Zhang et al., 2016).

El consumidor actual busca fundamentalmente productos con menos compuestos sintéticos, más saludables, alimentos de alta calidad que mantengan las características organolépticas y, que sean a la vez, inocuos desde el punto de vista microbiológico y químico, previniendo el crecimiento bacteriano o retrasando su deterioro. Es aquí donde las sustancias antimicrobianas naturales pueden jugar un papel importante y alternativo a los conservantes sintéticos. También pueden ayudar a disminuir el uso reiterado de antibióticos en ganadería, reduciendo de esta manera, el problema de las resistencias bacterianas, pues se ha demostrado su eficacia *in vitro* frente a

bacterias resistentes, bien empleados junto a antibióticos o solos (Palaniappan y Holley, 2010; Zanini et al., 2014a, 2014b).

En conclusión, el impacto negativo de conservantes sintéticos frente a los beneficios de las sustancias naturales antimicrobianas ha potenciado el interés por regular la inocuidad de estas sustancias naturales mediante estudios de toxicidad y mecanismos de acción (N. K. Lee y Paik, 2016).

Los antimicrobianos naturales pueden tener un origen diverso; vegetal, animal, bacteriano o como se ha visto recientemente, pueden proceder de algas y de hongos. El conocimiento de la inocuidad, eficacia y especificidad de estas sustancias por parte de la industria se convierte en objetivo principal para satisfacer las crecientes necesidades de un consumidor más consciente del impacto en su salud del nivel de calidad de los alimentos consumidos.

Davidson et al. (2013) indicaron cuáles deberían ser las características de un antimicrobiano natural ideal: tener efectividad a bajas concentraciones en su forma natural, no producir cambios en las cualidades sensoriales del producto, inhibir gran parte de los microorganismos patógenos y los responsables del deterioro de los alimentos, ser económico y no tóxico.

### **II.3.1 Antimicrobianos naturales procedentes de vegetales**

La industria alimentaria está interesada en el uso de los extractos vegetales y los aceites esenciales por su papel antioxidante y antimicrobiano, bien de forma aislada o en combinación con otros compuestos o tecnologías de procesado (Chouhan et al., 2017).

Existen más de 1.389 plantas con sustancias que presentan potencial



antimicrobiano según Wilkins y Board (1989), y por tanto su estudio cobra especial interés en el ámbito alimentario. En el reino vegetal se generan metabolitos primarios y secundarios. Mientras que los primeros son necesarios para el desarrollo fisiológico esencial de las plantas y se producen en grandes cantidades (como carbohidratos, lípidos, ácidos grasos y proteínas), los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y ejercen una función suplementaria en relación con el medio externo (como por ejemplo la defensa frente a depredadores). Además, la síntesis de determinados metabolitos secundarios en ocasiones se restringe a un género, familia o especie vegetal concreta.

Goldberg (2003) estableció una clasificación de los metabolitos secundarios vegetales:

- Terpenoides (carotenoides, esteroides, glicósidos cardiotónicos y volátiles)
- Compuestos fenólicos (lignanós, ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas, estilbenos y flavonoides)
- Compuestos nitrogenados (glucósidos cianogénicos, alcaloides y aminoácidos no proteicos)
- Compuestos sulfurados (glutación, glucosinolatos, fitoalexinas, tioninas, defensinas y lectinas)

La capacidad antimicrobiana frente a patógenos alimentarios viene determinada por la estructura química de los componentes vegetales con dicha actividad y la posición de los grupos funcionales, de la concentración de uso y del microorganismo (Dorman y Deans, 2000; Sanz-Puig et al., 2015).

Los principales compuestos vegetales con capacidad antimicrobiana son fenoles (flavonoides y no flavonoides), terpenos, alcoholes alifáticos, y ácidos orgánicos. Estas sustancias se encuentran en diversas partes de

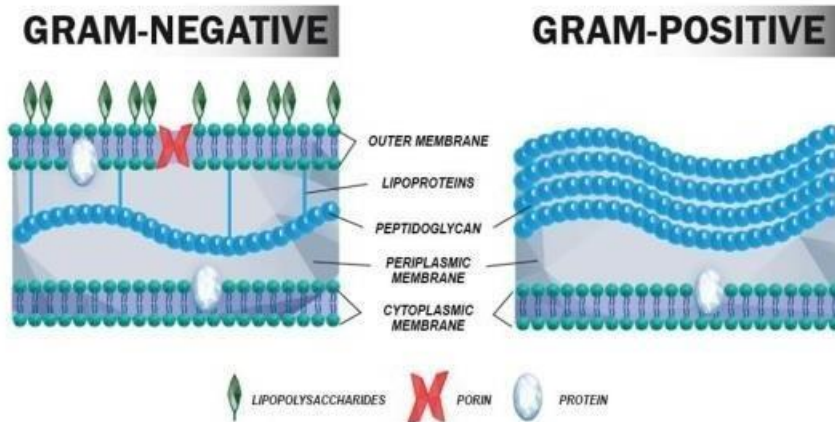
la planta como por ejemplo raíces, flores, hojas y semillas (Arshad y Batool, 2017; Pisoschi et al., 2018). El mecanismo de acción antimicrobiano de los compuestos fenólicos no se conoce totalmente, pero se ha relacionado con la modificación en la permeabilidad de la membrana celular y rotura de la membrana citoplasmática así como con cambios en funciones intracelulares por unión del compuesto fenólico con enzimas a través del grupo hidroxilo.

La capacidad antimicrobiana de los fenoles depende en general de su concentración (concentraciones altas producen desnaturalización proteica y concentraciones bajas actúan inhibiendo enzimas), carácter lipofílico (a mayor lipofilia, mayor penetración a través de la membrana celular, pérdida de moléculas intracelulares y mayor capacidad antimicrobiana), el número de dobles enlaces (a mayor número de dobles enlaces, mayor capacidad antimicrobiana) (Bouarab-Chibane et al., 2018; Farag et al., 1989; Pisoschi et al., 2018) y del número y posición de grupos hidroxilo en el anillo aromático. En algunos casos igual número de dobles enlaces pero distinta posición de los grupos  $-OH$  no parece afectar la capacidad antimicrobiana (Gochev et al., 2010; Griffin et al., 1999). Además, también influyen en la capacidad antimicrobiana el tipo y tamaño de grupos alquilo sustituyendo en el núcleo fenol (Dorman y Deans, 2000), así como grupos acetato (Dorman y Deans, 2000) y aldehído (Moleyar y Narasimham, 1986). En la mayoría de los casos, la capacidad antimicrobiana de los fenoles también está asociada a un efecto antioxidante, conferido por el grupo  $-OH$  libre del ácido fenólico o derivados, siendo el atrapamiento de radicales libres el principal mecanismo antioxidante de éstos compuestos orgánicos (Pisoschi et al., 2015; Stojković et al., 2013).

Los aceites esenciales son componentes aromáticos liposolubles de las plantas que pueden ejercer funciones antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida y

de protección frente a animales (Bakkali et al., 2008), así como antioxidante y antiséptica (R. Singh et al., 2015). La eficiencia antimicrobiana de dichos aceites como bacteriostáticos o bactericidas, depende del tipo de microorganismo, de la concentración e interacciones entre los principales componentes activos del aceite esencial. Aunque no se conocen con certeza los mecanismos de acción de los aceites esenciales, se sabe que son capaces de degradar la pared celular y dañar la membrana citoplasmática mediante una permeabilización que conlleva pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, colapso de la bomba de protones, disminución de ATP y muerte celular. Los componentes del aceite esencial también pueden inactivar enzimas integradas en la membrana, interrumpiendo funciones celulares vitales, así como penetrar la membrana celular y afectar la síntesis de lípidos de membrana (Dreger y Wielgus, 2013; Nazzaro et al., 2019) (Figura II.1).

No obstante, existen limitaciones en el uso de los aceites esenciales para conservación alimentaria pues las concentraciones con efecto antimicrobiano generan habitualmente colores y/o sabores intensos rechazados por el consumidor (Bagamboula et al., 2004). No obstante, muchos aceites esenciales y sus componentes se usan como aditivos alimentarios pues han sido aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) (Pandey et al., 2017).



**Figura II.1.** Pared celular bacteriana: Gram negativa (imagen a la izquierda) y Gram positiva (imagen a la derecha) (Chaudhuri y Chaudhuri, 2018).

### II.3.1.1 Potencial antimicrobiano de *Brassica oleracea* var. *botrytis* (coliflor)

Muchos vegetales de la familia *Cruciferae* tienen propiedades antimicrobianas frente a varios microorganismos de importancia clínica o transmisores de enfermedades de origen alimentario. Brandi et al. (2006) estudiaron el efecto del jugo de hojas frescas de *Brassica oleracea* var. *botrytis* sobre patógenos alimentarios, demostrando inhibición *in vitro* del crecimiento de *Salmonella Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 verotoxigénica, *E. coli* HB productora de la toxina termolábil, *E. coli* no toxigénica y *Listeria monocytogenes*. La población de *Salmonella* disminuyó en más del 95% al exponer la bacteria durante 5 horas a una concentración de 20% de jugo, consiguiendo una duración del efecto bactericida hasta 24 horas en el caso de una concentración de inóculo inicial de  $10^4$  UFC/mL. La exposición al jugo de *Brassica oleracea* al 20% durante 5 horas consiguió además una reducción de hasta 3 ciclos logarítmicos en

cepas patógenas de *E. coli*, y más de 2 ciclos logarítmicos en el caso de *L. monocytogenes*. Se observó por tanto un efecto bactericida frente a todos los patógenos mencionados con una reducción de más de 1 ciclo logarítmico respecto a la concentración inicial, excepto en el caso de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) donde se detectó un crecimiento de la población microbiana. Sin embargo, el jugo no resultó tener ningún efecto en la producción de verocitotoxinas de *E. coli* enterohemorrágico, posiblemente por las concentraciones de jugo usadas. Se hipotetizó que uno de los posibles mecanismos de acción antimicrobianos del jugo podría estar relacionado con el bloqueo de grupos sulfidrido de enzimas celulares. Sanz-Puig et al. (2017) llevaron a cabo estudios *in vitro* de la inhibición producida por una infusión de subproductos de coliflor al 10% (p/v) frente a un inóculo de  $10^8$  UFC/mL de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* a 37 y 10 °C. Después de 10h de exposición a la infusión a 37 °C y de 110 h a 10 °C, la población de *Salmonella* se redujo 5 ciclos logarítmicos. Además, se observó un efecto antimicrobiano sinérgico al combinar el antimicrobiano natural con técnicas no térmicas de conservación como las altas presiones hidrostáticas (200 MPa – 2 min), resultando en una reducción de 5 ciclos logarítmicos después de una incubación de 5 h a 37 °C y de 80 h a 10 °C.

Se han realizado otros estudios sobre el efecto antimicrobiano de una infusión de hojas de coliflor a distintas concentraciones (0 al 15% (p/v)) frente a *Listeria monocytogenes* a 5, 10 y 22 °C. El máximo efecto bactericida frente a dicha bacteria se observó con el tratamiento de concentración al 15% (p/v) de infusión de coliflor a 5 °C, resultando en una reducción de 2,25 ciclos logarítmicos después de una exposición de 20 días (Sanz-Puig et al., 2015).

### II.3.2 Antimicrobianos naturales procedentes de animales

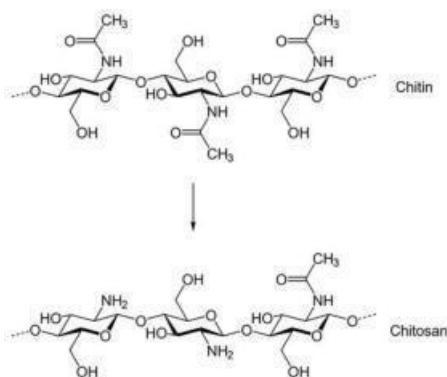
La mayoría de antimicrobianos de origen animal son sustancias de defensa animal como ocurre con los compuestos procedentes de las plantas (Pisoschi et al., 2018). Entre las sustancias antimicrobianas de origen animal están los péptidos, los polisacáridos y los lípidos.

Quizá dentro de los polisacáridos, el quitosano está alcanzando gran popularidad por diferentes razones. Es un subproducto de la industria pesquera (derivado de la quitina) por lo que su aprovechamiento tiene interés ecológico y ha mostrado cierta capacidad antimicrobiana, además de poseer propiedades bioactivas. El quitosano procede de la quitina que es un homopolisacárido lineal formado por unidades de N-acetil D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. La quitina se encuentra formando parte del exoesqueleto de artrópodos como crustáceos e insectos, aunque también está presente en la estructura interna de invertebrados y en la pared celular de algunos hongos (como *Aspergillus* y *Mucor*) (van den Broek y Boeriu, 2019) (Tabla II.1). Se estima una biosíntesis de  $10^{10}$ - $10^{11}$  toneladas anuales, de las cuales 150.000 toneladas son destinadas a uso comercial. Se considera el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Al igual que esta, su función es estructural (Ifuku y Saimoto, 2012; Sahoo et al., 2002). Este compuesto nitrogenado presenta 3 formas poliméricas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), de las cuales la  $\alpha$ -quitina es la más frecuente (van den Broek y Boeriu, 2019).

**Tabla II.1.** Fuentes de quitina y quitosano (Zargar et al., 2015).

<b>Animales marinos</b>	<b>Insectos</b>	<b>Microorganismos</b>
Crustáceos	Escorpiones	Algas verdes
Celentéreos	Braquiópodos	Hongo (paredes celulares)
Anélidos	Cucarachas	Micelio de <i>Penicillium</i>
Moluscos	Arañas	Algas marrones
Langosta	Escarabajos	Esporas
Langostinos	Hormigas	
Gamba		
Camarón antártico		
Cangrejo		

El quitosano es un polisacárido lineal formado por cadenas de D- glucosamina y N-acetil D-glucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4)-glucosídicos que se obtiene por desacetilación parcial de la quitina, dejando libre el grupo amino del carbono-2 (Figura II.2).



**Figura II.2.** Estructura de quitina (imagen superior) y quitosano (imagen inferior).

La quitina se caracteriza por ser blanca, rígida, prácticamente insoluble en agua y en la mayoría de disolventes orgánicos por sus fuertes enlaces inter e intramoleculares por puentes de hidrógeno, existiendo únicamente disolventes tóxicos, corrosivos e incluso cancerígenos para su disolución. Esta baja solubilidad es una limitación en su aplicabilidad. Para superar este inconveniente, se han obtenido derivados por desacetilación como el quitosano, el cual es soluble en disolución acuosa diluida de ácidos orgánicos (ácido acético, fórmico, acrílico) e inorgánicos (ácido clorhídrico) a pH menor que su pKa (~ 6.3-6.5), pero insoluble en agua a pH neutro, pH alcalino y en algunos disolventes orgánicos. Además de depender del pH, la solubilización del quitosano depende de su grado de desacetilación y del peso molecular (Roy et al., 2017; Shirvan et al., 2019).

El grado de desacetilación es “el número promedio de unidades de D-glucosamina por cada 100 monómeros expresado en porcentaje” (Shirvan et al., 2019) y aumenta conforme la quitina se transforma en quitosano. La fuente de quitina, la concentración de NaOH, la temperatura, el tiempo y el método de extracción empleados para la obtención de quitosano son factores que determinan el grado de desacetilación de la quitina, cuyo intervalo se encuentra entre un 56 a un 99%. Existen distintas opiniones sobre el porcentaje de desacetilación de la quitina a partir del cual se denomina quitosano. Unos autores consideran quitosano a partir de un grado de desacetilación del 75% (No y Meyers, 1995) mientras que otros lo consideran a partir del 50% (Rinaudo, 2006). Es necesario un grado de desacetilación de al menos un 85% para una buena solubilidad del quitosano pues conseguir una desacetilación del 100% es muy difícil (No y Meyers, 1995; Roy et al., 2017; van den Broek y Boeriu, 2019).



Respecto al peso molecular, la quitina alcanza valores mayores a 1 millón de Dalton y el quitosano comercial oscila entre 100.000 y 1.000.000 Dalton, todo dependiendo de la fuente y el método de extracción de quitosano (M. N. V. R. Kumar, 2000; Shirvan et al., 2019).

El grado de desacetilación, peso molecular, pH y temperatura van a determinar otra de las propiedades del quitosano, la viscosidad, la cual parece relacionarse con la capacidad antimicrobiana (Cho et al., 1998; Shirvan et al., 2019).

### **II.3.2.1 Acción antimicrobiana del quitosano**

En diversos trabajos se ha puesto de manifiesto la capacidad antimicrobiana del quitosano (Erdem et al., 2016; Jadhav y Diwan, 2018; Jovanović et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos bactericida y bacteriostático del quitosano están aún por determinar, pero sí se sabe que el quitosano debe estar en forma policatiónica para que desarrolle su efecto antimicrobiano. Se han propuesto 3 mecanismos de acción (Bretado Aragón et al., 2018):

1. Interacción de las cargas positivas del quitosano (grupos amino de moléculas de glucosamina) con los aniones de componentes de la pared bacteriana provocando una modificación de la funcionalidad e integridad de la pared celular. La acción del quitosano en bacterias Gram negativas tiene lugar por la interacción de los grupos amino protonados con el lipopolisacárido (LPS) (carga negativa) ubicado en la membrana externa de la pared celular, alterando la permeabilidad celular (membrana externa e interna) y posibilitando el flujo de sustancias, como la entrada de sustancias hidrofóbicas y tóxicos entre otros, y la salida de componentes celulares, para finalmente producir la muerte celular. El mecanismo de acción en bacterias Gram positivas consiste en la interacción de las cargas catiónicas del quitosano con las cargas negativas de

los ácidos teicoicos situados en la pared celular y posterior modificación de la interacción membrana-pared celular, desequilibrio osmótico (incluso cuando la pared y membrana celulares permanecen intactas) y salida de moléculas e iones esenciales.

2. Interacción entre quitosano con moléculas intracelulares cargadas negativamente. El quitosano altera la permeabilidad celular y atraviesa la pared y membranas celulares, y una vez en el citoplasma se puede unir a moléculas de ADN (carga negativa) inhibiendo la síntesis de ARNm y de proteínas.

3. Quelación de metales. Los grupos amino del quitosano capturan metales esenciales para el crecimiento bacteriano como níquel, zinc, cobre, cobalto, hierro, magnesio, contribuyendo a la muerte celular. Además, si el quitosano se une a los cationes de calcio y magnesio de la membrana celular, se producirá la lisis de ésta. La quelación depende del número limitado de sitios disponibles para la interacción y la saturación del complejo a determinadas concentraciones del metal (Goy et al., 2009).

Se han descrito una serie de factores que influyen en la eficacia antimicrobiana del quitosano. Dichos factores están relacionados con los microorganismos (especie microbiana y fase de crecimiento celular), otros son factores intrínsecos del quitosano (peso molecular, número de cargas positivas, carácter hidrofílico/hidrofóbico, capacidad quelante), factores físicos (estado sólido o soluble) y factores ambientales (fuerza iónica en el medio, pH, temperatura y tiempo de reacción).

➤ Factores microbianos:

- Relacionados con diferencias estructurales entre microorganismos: existen diversas opiniones sobre el tipo de bacteria, Gram positiva o Gram negativa, más sensible al quitosano (Ganan et al., 2009; No et al., 2002) e incluso estudios donde no se han demostrado dichas diferencias (X. Wang et al. 2004). Sin embargo, se ha descrito que la acción antimicrobiana del quitosano parece ser mayor en hongos que en bacterias (Savard et al., 2002).
- Relacionados con la fase de crecimiento: parece ser que según la fase de crecimiento variará el número de cargas negativas, pudiendo generar diferencias en cuanto a su sensibilidad hacia el quitosano. Por ejemplo, se ha demostrado que las cargas negativas de la superficie celular de *E. coli* aumentan progresivamente desde el principio de la fase exponencial hasta el final de dicha fase, pero, sin embargo, la electronegatividad celular decrece después del principio de la fase estacionaria (Gilbert et al., 1991). Esto podría estar relacionado con una mayor sensibilidad de las células bacterianas de *E. coli* en la fase exponencial final, seguido de las células en la fase estacionaria y en la fase exponencial intermedia (Tsai y Su, 1999).

➤ Factores intrínsecos:

- Densidad de carga positiva: está vinculada con el grado de desacetilación del quitosano por lo que la interacción del quitosano será mayor a mayor número de cargas positivas disponibles para unirse a componentes celulares con carga opuesta.
- Peso molecular: son necesarios más estudios para demostrar la influencia en el efecto antimicrobiano del quitosano.

- **Carácter hidrofílico/hidrofóbico:** la proporción de grupos acetilados y desacetilados en el quitosano determina que las interacciones sean de tipo hidrofílicas o hidrofóbicas, actuando así como una molécula anfifílica (Kumirska et al., 2011).

- **Capacidad quelante:** los iones metálicos que se encuentran unidos a la pared celular bacteriana proporcionan estabilidad a la pared. Así, es posible que parte del efecto antimicrobiano se deba a la unión del quitosano con metales como níquel, zinc, cobalto, hierro, magnesio y cobre, tanto en condiciones ácidas como neutras (Kong, Chen, Liu, et al., 2008).

➤ **Estado físico:**

- **En disolución:** el quitosano y derivados están ionizados en disoluciones ácidas lo que permite una mayor inhibición bacteriana teniendo en cuenta la influencia de factores ambientales, como el pH (mayor solubilidad y protonación del quitosano cuando el pH es menor que el pKa del quitosano), e intrínsecos, como el peso molecular y grado de desacetilación.

- **En estado sólido (como por ejemplo fibras, hidrogeles, membranas, microesferas y nanopartículas):** influyen el tamaño de partícula, grosor de membrana y fibra, el carácter hidrofóbico/hidrofílico y el grado de desacetilación.

➤ **Factores medioambientales:**

- **pH:** la capacidad antimicrobiana del quitosano es mayor a pH bajo, pero ésta se reduciendo conforme aumenta el valor de pH, probablemente debido a una mayoría de grupos amino sin protonar y baja solubilidad del quitosano a pH neutro (Kong, Chen, Xue, et al., 2008). Sin embargo, hay

estudios que muestran un efecto antimicrobiano a pH alrededor de 8,0, valores mayores que el pKa del quitosano (6,3-6,5), posiblemente por el efecto de otros factores en la actividad antimicrobiana como la especie microbiana (Chen y Chung, 2012).

- Fuerza iónica: un aumento de iones con carga positiva en el medio, provocará una competición del quitosano cargado positivamente por los componentes negativos de la pared celular bacteriana, disminuyendo su capacidad antimicrobiana. Un aumento de aniones también parece disminuir la capacidad antimicrobiana.
- Temperatura y tiempo: Estos factores pueden alterar la capacidad antimicrobiana en cuanto que pueden afectar al peso molecular, viscosidad o características específicas del quitosano.

### **II.3.3 Antimicrobianos naturales procedentes de cianobacterias**

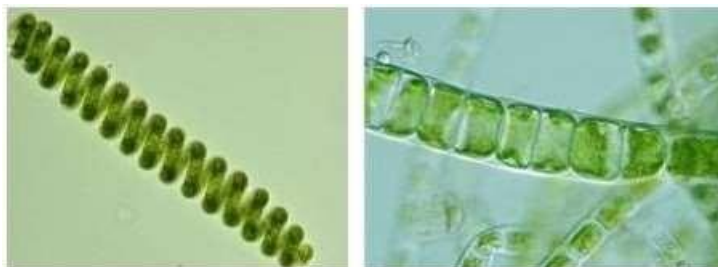
En los últimos años, se viene prestando una atención especial a las algas comestibles, entre otras cosas por su posible capacidad antimicrobiana, lo que las convierte en un recurso muy interesante a explotar. Aunque las algas comestibles no forman un residuo alimentario a revalorizar, sí impactan positivamente en el medio ambiente debido a que su uso como fuente alternativa de proteína produce menor desgaste de recursos naturales, y por consiguiente, su huella en el medio ambiente es menor que la producida por los animales de granja.

Las algas han surgido como una alternativa natural y fuente potencial de compuestos bioactivos de aplicación en la industria alimentaria, nutracéutica, cosmética, química (tinciones y colorantes), agrícola (fertilizantes y bioestimulantes del crecimiento), en acuicultura y como fuente energética

(biofuel) (Michalak y Chojnacka, 2018). Los extractos de algas pueden contener sustancias con actividad antimicrobiana como terpenoides, fenoles, alcaloides, polisacáridos, ácidos grasos, proteínas, aminoácidos e inclusive toxinas peptídicas como las microcistinas generadas por cianobacterias (Alghazeer et al., 2013; Al-Saif et al., 2014; Bajpai, 2016; Guzmán et al., 2019; Pina-Pérez et al., 2017; Ramos et al., 2015). Desde el punto de vista biotecnológico, las algas se pueden clasificar en microalgas y macroalgas. Las microalgas son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica y pueden ser procariontas (cianobacterias) o eucariotas (restantes microalgas).

Algunas de las algas más populares bajo el punto de vista de su aplicación en la industria agroalimentaria y otras industrias dentro del grupo de cianobacterias son *Arthrospira platensis* y *Arthrospira maxima* (conocidas como *Spirulina platensis* y *Spirulina maxima*). Las cianobacterias, o también llamadas algas verde-azuladas, fueron los primeros organismos vivos fotosintéticos hace 3600 millones de años que usaron la luz como fuente de energía, el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono así como los átomos de hidrógeno del agua para reducir el CO<sub>2</sub>, sintetizando O<sub>2</sub> e hidratos de carbono. Incluidas en el dominio Bacteria, poseen una estructura procarionta, es decir, sin núcleo celular definido, considerándose los únicos procariontas que realizan fotosíntesis oxigénica. Se pueden encontrar en diversos hábitats terrestres (suelo, desiertos, cortezas de árboles) y acuáticos (agua dulce y salada) e incluso en condiciones extremas (Chu y Phang, 2019; Mateo et al., 2015). Las cianobacterias están formadas por células individuales, que forman colonias o filamentos, siendo más frecuentes las formas filamentosas. Su tamaño es variable abarcando desde pocos milímetros hasta formaciones macroscópicas de 30 cm (Mohr et al., 2011; Raven, 1998) (Figura II.3).

**Figura II.3.** Tricomatas de *Arthrospira platensis* (Borowitzka, 2018; Karali, F., 2011).



### II.3.3.1 Acción antimicrobiana de *Arthrospira* spp. (*Spirulina* spp.)

Se ha puesto de manifiesto en diferentes trabajos que los extractos obtenidos de *Arthrospira maxima* y *Arthrospira platensis* presentan cierta actividad antimicrobiana frente a determinados patógenos bacterianos (*E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Shigella shigae*, *Salmonella typhi*; *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) (Kulandaivel et al., 2007; Mala et al., 2009; Medina-Jaritz et al., 2012; F. Ramadan et al., 2008), hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Medina-Jaritz et al., 2012; F. Ramadan et al., 2008). Esta capacidad antimicrobiana se ha relacionado con la presencia de algunos componentes lipídicos como ácido  $\gamma$ -linolénico (Demule et al., 1996), láurico, palmitoleico (Mendiola et al., 2007; Ouattara et al., 1997), polisacáridos extracelulares (Rafika et al., 2011) y ficobiliproteínas como la C- ficocianina (Safari et al., 2019). No obstante, el efecto antimicrobiano depende del microorganismo, del tipo de alga, el disolvente empleado para su extracción y la concentración del extracto (Pina-Pérez et al., 2017).

Diversos estudios han constatado una reducción bacteriana tras la exposición a

espirulina (El-Sheekh et al., 2014; Hamouda y Doumandji, 2017; Mala et al., 2009; Pratita et al., 2019). Extractos de espirulina en acetona, etanol, metanol, éter de petróleo y dietil éter han mostrado eficacia bacteriana dependiendo de la especie bacteriana y el disolvente empleado (Mala et al., 2009). Hamouda y Doumandji (2017) demostraron que en general, los extractos de *Spirulina platensis* resultaron más eficaces frente a las bacterias Gram negativas que Gram positivas. Los extractos obtenidos con hexano-etanólico y acetónico fueron los más efectivos frente *E. coli* y el extracto metanólico fue el más efectivo frente *S. Typhimurium*, aunque no hubo signos de inhibición cuando esta última bacteria se expuso a extractos de diclorometano y acetona. A su vez, El-Baz et al. (2013) tampoco hallaron signos de inhibición de *E. coli* ni de *Salmonella typhi* tras la exposición a un extracto etanólico de espirulina. El-Sheekh et al. (2014) observaron una actividad antimicrobiana de los extractos de *Spirulina platensis* con dietiléter y etilacetato frente a Gram positiva y negativa; aunque con extractos como el de éter de petróleo sólo fue efectivo frente a Gram negativa y con el extracto de n-hexano no tuvo efecto antimicrobiano. Respecto a *E. coli*, los mayores halos de inhibición se consiguieron con el extracto de acetato de etilo. El-Sheekh et al. (2014) también mencionaron que en su estudio y en el de Sastry y Rao (1994), el extracto de espirulina podría contener compuestos inhibitorios de la acción antimicrobiana frente a algunas especies bacterianas, lo que explicaría una reducción de la actividad antimicrobiana en el extracto de espirulina a diferencia del efecto antimicrobiano de las fracciones puras. Entre las ficobiliproteínas presentes en *Spirulina platensis*, la C-ficocianina (25 ppm) produjo siempre el mayor efecto inhibitorio en *E. coli* y *Listeria monocytogenes* a tiempo inicial y tras 60 días de exposición. A la C-ficocianina se le atribuye también actividad estimulante del sistema inmune (Eriksen, 2008) entre otras.



Estudios *in vivo* apoyan el efecto de la espirulina como estimulante del sistema inmune (Qureshi et al., 1995) y reducción de la concentración de bacterias coliformes en el contenido intestinal de pollos y codornices (Shanmugapriya, Saravana Babu, Hariharan, Sivaneswaran, Anusha, et al., 2015; Sugiharto et al., 2018; Yusuf et al., 2016)

## **II.4 Métodos para determinar la capacidad antimicrobiana**

### **II.4.1 *In vitro***

Existen distintos métodos *in vitro* para determinar la susceptibilidad microbiana a un antimicrobiano (sensibilidad). Entre los más comunes encontramos los métodos fenotípicos (técnicas de difusión y de dilución), aunque existen también métodos bioquímicos y métodos genéticos con los que se determinan respectivamente mecanismos bioquímicos de resistencia o genes de resistencia (Cercenado y Saavedra, 2009).

#### a) Métodos de difusión.

El método de difusión en agar con discos o en pozos es un método cualitativo que consiste en evaluar el efecto de determinadas sustancias sobre microorganismos basándose en la relación concentración de la sustancia empleada y halo de inhibición de crecimiento producido. Según las normas de interpretación establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), los resultados obtenidos clasifican a los microorganismos en categorías clínicas: sensible, si existe una alta probabilidad de éxito terapéutico a la dosis habitual; intermedia, si el éxito terapéutico es incierto, pudiendo conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de dosis); y resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o

muy reducida (no se espera efecto terapéutico).

Para el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) se procede a la siembra del microorganismo de interés en placa de agar con un medio de cultivo adecuado. Sobre dicha placa se depositan discos de papel de filtro (6 mm de diámetro) impregnados en 10-25  $\mu\text{L}$  de la sustancia que queremos estudiar, además de preparar discos estándares y blancos. Tras la incubación de la placa durante el tiempo requerido, se realiza la medición de los halos de inhibición abarcando también el diámetro de los discos (Sánchez-García et al., 2016).

El método modificado de pozos de agar consiste en realizar una siembra bacteriana sobre la superficie de una placa de agar selectivo, y a continuación formar pozos sobre la superficie del agar (6 mm de diámetro) mediante un sacabocados estéril, dentro de los cuales se añadirán 10-25  $\mu\text{L}$  de la sustancia de interés, estándares (control positivo y negativo) y blanco. Tras 30 minutos de reposo para permitir la evaporación del líquido, la placa se incuba el tiempo necesario y se procede a medir los halos de inhibición de crecimiento incluyendo el diámetro de los discos (Sánchez-García et al., 2016).

Existe una correlación entre los métodos de difusión y los de dilución, en concreto, entre el diámetro del halo de inhibición (método de difusión) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) (método de dilución), de manera que, los halos pequeños se vinculan a valores altos de CMI (bacterias resistentes) y los halos grandes están relacionados con CMI bajas (bacterias sensibles).

Otra técnica de difusión es el E-test (prueba de epsilometría), técnica cuantitativa que se basa en el método de difusión en agar haciendo crecer la bacteria en un medio en placa sobre el cual se colocarán tiras de plástico impregnadas con la sustancia a estudiar en concentraciones decrecientes. El

antimicrobiano difundirá al contacto de la tira con el agar, generando un gradiente, y tras la incubación de la placa se observará un halo de inhibición elíptico cuyo punto de intersección con la tira marcará el valor de CMI impreso en la superficie de la tira. Por tanto, es un método cuantitativo. Los resultados de esta técnica deben confirmarse mediante pruebas de sensibilidad estandarizadas con bacterias en cultivo puro (Cercenado y Saavedra, 2009).

b) Métodos de dilución.

Estos métodos permiten cuantificar la actividad antimicrobiana mediante la mezcla de una determinada cantidad de una sustancia junto al medio de cultivo (sólido o líquido).

Se define la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración más baja de sustancia (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en condiciones estandarizadas, y la concentración mínima bactericida (CMB) como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina *in vitro* a más del 99,9% de los microorganismos viables en condiciones estándares.

Si el valor de CMI es igual a CMB de un antimicrobiano, la sustancia es bactericida. Si el valor de CMB es mucho mayor que CMI, la sustancia es bacteriostática. Por otro lado, la tolerancia del microorganismo a la sustancia a estudiar viene determinada por una CMB de al menos 16-32 veces mayor que la CMI.

Entre los métodos de dilución distinguimos el método de dilución en agar y el método de dilución en medio líquido.

El método de dilución en agar consiste en mezclar agar con una cantidad conocida de sustancia de interés hasta conseguir una concentración final. Posteriormente se procede a la siembra bacteriana por extensión en la superficie de agar, incubación y recuento de colonias bacterianas.

El método de dilución en medio líquido es idéntico al método de dilución en agar, aunque los resultados de crecimiento o viabilidad microbiana se pueden interpretar a parte de por recuento microbiano, por turbidimetría e indicadores de oxidación-reducción (indicadores REDOX). Se realizan mediciones espectrofotométricas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para determinar crecimiento microbiano y a 540-570 nm para determinación REDOX.

Las ventajas de los métodos por dilución en medio líquido frente a los métodos de difusión son una mayor sensibilidad y reproducibilidad. Además, los métodos por dilución en medio líquido permiten evaluar y cuantificar, en función de la concentración de antimicrobiano y del tiempo de exposición, su capacidad bactericida mediante el ajuste a modelos matemáticos predictivos de inactivación/supervivencia microbiana.

#### **II.4.2 *In vivo***

Aunque la primera aproximación para estudiar la capacidad antimicrobiana de los agentes químicos, naturales o sintéticos son los estudios *in vitro*, es importante saber cómo es la respuesta del microorganismo *in vivo*, ya que la efectividad de los antimicrobianos se puede ver afectada por las características particulares de un alimento o del tracto digestivo de los seres vivos. Para los estudios *in vivo*, se han utilizado diferentes aproximaciones más o menos complejas, por ejemplo, líneas celulares como modelo biológico, utilizadas sobre todo para evaluar el potencial antimicrobiano de algunos antibióticos.

Suchland et al. (2003) llevaron a cabo estudios sobre metodologías y líneas celulares utilizadas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de *Chlamydia* spp. Otros modelos para estudios *in vivo* se han basado en el uso de mamíferos como ratones o ratas de laboratorio, cobayas y conejos, entre otros. B.-C. Lee et al. (2009) realizaron un estudio para evaluar el efecto antimicrobiano del quitosano sobre *Vibrio vulnificus* en ratones. Choi et al. (2011) llevaron a cabo estudios *in vivo* para determinar la capacidad antibacteriana de un extracto etanólico de piel de *Punica granatum* frente a *Salmonella* utilizando ratones como organismos modelo. M. Ramadan et al. (2015) estudiaron la capacidad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de nanocompuestos de quitosano injertado con poliacrilonitrilo/plata contra bacterias patógenas. En estos estudios se usaron ratas Wistar como modelo animal para probar la capacidad antimicrobiana. David et al. (2016) estudiaron la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de enterocina parcialmente purificada producida por *Enterococcus faecalis*. El estudio *in vivo* se llevó a cabo también con ratas Wistar sanas.

Actualmente, se está viendo el potencial de modelos *in vivo* alternativos, más sencillos y económicos y con resultados más a corto plazo. Este es el caso del *C. elegans* que ha surgido como opción en los estudios *in vivo* de exposición a patógenos y sustancias con potencial antimicrobiano. Este nematodo permite, además, realizar una pre-evaluación de la toxicidad de las sustancias, mostrando una clara ventaja frente a modelos *in vivo* más complejos (C. Kong et al., 2016). En algunos trabajos se ha visto incluso que la dosis de antimicrobiano antibiótica efectiva para *C. elegans* ha sido similar a la concentración terapéutica sanguínea en humanos (Moy et al., 2006).

Los estudios *in vivo* tienen sus ventajas y desventajas. Por un lado, permiten determinar los efectos finales y totales de una experimentación y los resultados

estarán más cercanos a lo que puede ocurrir en el ser humano. Sin embargo, el estudio de antimicrobianos *in vivo* puede presentar algunas desventajas frente a los estudios *in vitro*, siendo más complejos y consumiendo más tiempo en su ejecución, costes económicos importantes, y pueden estar sujetos a restricciones éticas al tratar con animales vivos (De la Fuente-Salcido et al., 2015).

## **II.5 Uso de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como organismo modelo.**

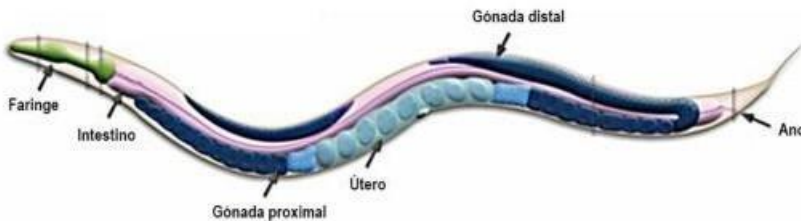
*Caenorhabditis elegans* es un nematodo colonizador de hábitats ricos en microorganismos, particularmente, en materia vegetal en descomposición presente en la naturaleza. Desde 1960 se ha utilizado en estudios como organismo modelo para la biología eucariota ya que fue el primer organismo multicelular del que se conoció su secuencia genómica completa (Altun y Hall, 2009; Félix y Braendle, 2010).

De entre las ventajas del empleo de *C. elegans* como modelo destacan su sencillez, pequeño tamaño (el nematodo adulto mide 1 mm), transparencia, con un 60-80% de genes homólogos con el genoma humano (de los cuales el 40% se relacionan con enfermedades humanas), número de células invariable (959 células somáticas), fácil manipulación, tiempo corto de generación, tasa de reproducción alta, ciclo de vida corto (2-3 semanas), con posibilidad de congelar poblaciones durante años y revivirlas cuando se necesite (-80 °C) (Stiernagle, 1999), y crecimiento tanto en medio sólido como líquido. Además, este nematodo es inocuo para el humano pues no crece a temperatura corporal humana, y permite realizar estudios más económicos que con animales superiores. Su transparencia hace posible el estudio de procesos biológicos incluso a nivel celular (Corsi et al., 2015).

### II.5.1 Fisiología y ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*

*C. elegans* posee un cuerpo cilíndrico estrechado en los extremos y formado por dos tubos concéntricos separados por una cavidad llena de fluido llamada pseudoceloma. Los órganos y tejidos están organizados en pared corporal (cutícula, sistema epitelial, nervioso, muscular y excretor), órganos de la cavidad del pseudoceloma (el pseudoceloma está formado por 6 coelomocitos, células que endocitan y acumulan macromoléculas de los fluidos corporales y cuya función se relaciona con el sistema inmunitario del nematodo), y órganos internos (sistema digestivo y reproductor).

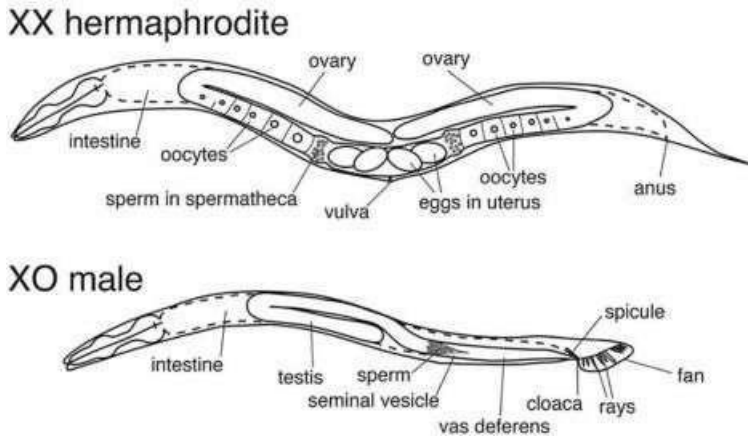
La figura II.4 muestra la anatomía de *C. elegans* adulto hermafrodita obtenida por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Altun y Hall, 2009). En ella se puede apreciar la situación y distribución de los principales órganos del nematodo.



**Figura II.4.** Anatomía de *C. elegans* adulto hermafrodita obtenida por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Altun y Hall, 2009). Imágenes modificadas.

En cuanto a su reproducción, los adultos hermafroditas tienen capacidad de autofecundación interna. Su sistema reproductor consta de dos ovarios en forma de “U” capaces de producir esperma (estadio L4) y ovocitos (fase adulta), una vulva y un útero. Cada ovario posee un oviducto, y una

espermateca donde se almacena el espermia y ocurre la fertilización (Corsi et al., 2015) (Figura II.5).



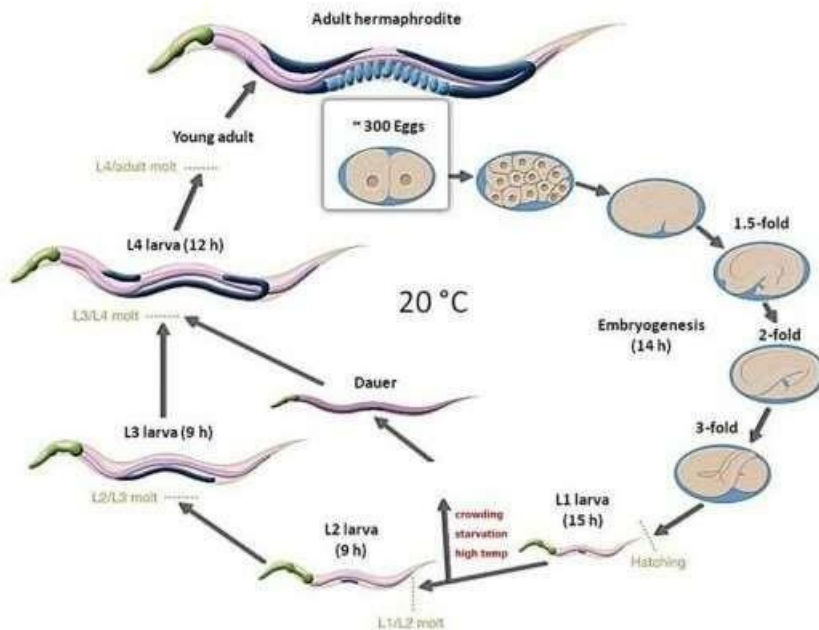
**Figura II.5.** Sexos de *C. elegans*: hermafrodita (XX) y macho (XO) (Zarkower, 2006).

Los hermafroditas adultos se reproducen durante 2 a 3 días dando lugar a una progenie de aproximadamente 300 huevos/gusano, tiempo tras el cual se ha agotado todo el espermia producido (Altun y Hall, 2009; Hodgkin, 1988).

El ciclo de vida de *C. elegans* comprende una fase embrionaria, una fase larvaria (estadios L1-L4) y una fase adulta con una duración de aproximadamente 3,5 días a 20 °C. Tras la fertilización, un cascarón impermeable envuelve al embrión para el desarrollo completo, el cual se mantiene en el interior del útero de la madre aproximadamente 3h, momento en el que el huevo es expulsado a través de la vulva, y aproximadamente 11 horas después, la larva L1 sale del cascarón. Se producen periodos de letargo al final de cada estadio larvario, momento en el que se formará una nueva cutícula de colágeno, se mudará la cutícula vieja y terminará el periodo de letargo. Transcurridos los estadios larvarios L2-L4, el nematodo adulto joven



se desarrollará hasta adulto con capacidad reproductiva, y después del periodo reproductivo, los hermafroditas viven varias semanas hasta morir. El ciclo de vida suele ser de 2-3 semanas (Altun y Hall, 2009; Hodgkin, 1988) (Figura II.6).



**Figura II.6.** Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C (modificado de Altun y Hall, 2009; Byerly et al., 1976).

*C. elegans* se ha utilizado como organismo modelo en los mecanismos de interacción patógeno-hospedador y en la respuesta ante la exposición a sustancias naturales. Tanto las bacterias Gram positivas y Gram negativas (*Pseudomonas*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Enterococcus*), así como algunos hongos pueden infectar al nematodo (Ewbank y Zugasti, 2011). La exposición al patógeno puede producir colonización intestinal y adherencia a la cutícula del nematodo. La exposición a *Salmonella* Typhimurium coloniza el intestino

del nematodo y también puede provocar un excesivo estrés oxidativo influyendo ambos hechos negativamente en su esperanza de vida (Aballay et al., 2000; Labrousse et al., 2000; Sem y Rhen, 2012). No obstante, el nematodo puede generar mecanismos de defensa como respuesta a la invasión microbiana, fundamentalmente péptidos antimicrobianos y proteínas (Ewbank y Zugasti, 2011).

Se han publicado trabajos en los que se ha demostrado la utilidad de este nematodo para analizar sustancias naturales antimicrobianas. Estudios con extractos acuosos, como un extracto de arándano eficaz frente a *V. cholerae* (Dinh et al., 2014), y en alcaloides como harmano, compuesto presente en coliflor que actúa frente a *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *Escherichia coli* O157:H7 han demostrado que refuerzan la respuesta inmune innata vinculado a un aumento de la esperanza de vida del nematodo (Jakobsen et al., 2013). Pigmentos de cianobacterias como la ficoeritrina y ficocianina son capaces de alargar la vida del nematodo a la vez que confieren resistencia frente al estrés oxidativo (N. Singh et al., 2015; Sonani, Singh, Kumar, et al., 2014).

## **II.6 Aplicación de la Alta Presión Hidrostática (HHP) en el campo alimentario: tecnología de barreras**

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales preocupaciones de las autoridades sanitarias sigue siendo garantizar la inocuidad microbiológica de los alimentos. Para ello, la principal herramienta es el establecimiento adecuado y posterior control de las diferentes estrategias de conservación de alimentos. En las últimas 3 décadas han surgido una serie de tecnologías no térmicas como alternativa a tratamientos térmicos ya que éstos suelen penalizar la calidad tanto sensorial como nutritiva de los alimentos esterilizados o

pasteurizados. Entre estas tecnologías, por su estado de desarrollo y su implantación a nivel industrial, cabe destacar las altas presiones hidrostáticas (HHP). La tecnología consiste en aplicar a los alimentos presiones entre 100 y 600 MPa durante, de forma general, unos pocos minutos (4-10 min) para la eliminación de microorganismos alterantes y patógenos (Pradas Baena y Moreno Rojas, 2016). Uno de los inconvenientes de muchas de estas tecnologías alternativas al tratamiento térmico, incluidas las altas presiones hidrostáticas, está relacionado con su eficacia para eliminar a todos los microorganismos presentes en los alimentos, y, fundamentalmente esporas bacterianas (Huang et al., 2020). Sin embargo, desde hace algunos años se viene prestando especial atención a los procesos combinados o “tecnología de barreras”. En estos procesos se aplican de manera conjunta diferentes métodos de control de los microorganismos a niveles más bajos que si se aplican solos, consiguiendo la estabilización microbiana con un menor impacto sobre las características nutricionales y sensoriales de los alimentos (Fouladkhah et al., 2019; Huang et al., 2020). En el caso del tratamiento HHP, implica reducir la intensidad o el tiempo de tratamiento, gracias al uso de otras tecnologías o métodos de conservación como antimicrobianos naturales.

Existen estudios que demuestran que, por lo general, los tratamientos combinados son más efectivos que un único tratamiento frente a los microorganismos. La combinación de las HHP junto a antimicrobianos como bacteriocinas (péptidos antimicrobianos producidos por algunas bacterias lácticas) o alguna otra sustancia natural antimicrobiana como por ejemplo carvacrol, ácido caprílico (Fouladkhah et al., 2019), vanilina, anís, canela (Pina- Pérez et al., 2009) o quitosano (Hu y Gänzle, 2019; S. Kumar et al., 2009; Malinowska-Pańczyk et al., 2009), potencian el efecto de las HHP de forma aditiva o sinérgica en el alimento.







# ***OBJETIVOS***

---





### III. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es evaluar la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales (coliflor, quitosano y espirulina) en algunos casos combinadas, además, con altas presiones hidrostáticas, frente a microorganismos patógenos alimentarios *in vitro* e *in vivo* usando *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como organismo modelo.

El objetivo general, se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de sustancias naturales (coliflor, quitosano y espirulina) sobre *C. elegans*.
2. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de sustancias naturales frente a patógenos alimentarios.
3. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de sustancias naturales combinadas con altas presiones hidrostáticas.
4. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vivo* de sustancias naturales en el tracto digestivo de *C. elegans*.







# ***PLAN DE TRABAJO***

---



## IV. PLAN DE TRABAJO

Para la consecución de los objetivos descritos se propone el siguiente plan de trabajo:

- 1. Evaluar el efecto de sustancias naturales (extracto de coliflor, quitosano y extracto de espirulina) sobre la supervivencia y pauta de puesta de huevos de *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*).**

Como paso previo al empleo de *C. elegans* como modelo *in vivo* para evaluar la capacidad antimicrobiana de determinadas sustancias naturales sobre patógenos alimentarios que han infectado a *C. elegans*, es necesario determinar el efecto que tienen dichas sustancias sobre el nematodo no infectado, ya que es posible que, en las condiciones estudiadas (por ej. concentración), resulten nocivas para *C. elegans*. En ese caso el nematodo no sería un buen modelo. Por lo tanto, en primer lugar se estudiará la supervivencia, se analizará la esperanza de vida y la pauta de puesta de huevos de *C. elegans* expuesto a un extracto de coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), a un extracto de espirulina comercial y a una disolución de quitosano como subproducto procedente de insectos y crustáceos. Los datos de supervivencia recogidos se analizarán con la finalidad de representarlos como funciones estimadas de supervivencia (método de Kaplan Meier) y funciones de riesgo acumulado. A su vez, se determinará el efecto de cada sustancia en la pauta de puesta de huevos de los nematodos.

- 2. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* frente a patógenos alimentarios (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*) de sustancias naturales para las que *C. elegans* no sea un buen modelo *in vivo*.**

Para aquellas sustancias naturales testadas en el apartado 1 que presenten incompatibilidades para llevar a cabo la determinación de la capacidad antimicrobiana con el modelo *in vivo*, se determinará la capacidad antimicrobiana *in vitro* por el método de incubación, dilución en medio líquido y recuento de viables en placa.

- 3. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro* del quitosano de insecto y de crustáceo combinadas con altas presiones hidrostáticas frente a *S. Typhimurium*: estudio del daño subletal.**

Después de evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* para aquellas sustancias naturales para las que *C. elegans* no es un buen modelo, y teniendo en cuenta la capacidad antimicrobiana limitada de dichas sustancias, se aplicará el concepto de tecnología de barreras para estudiar el posible efecto combinado del antimicrobiano y la tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) sobre la inactivación de *Salmonella Typhimurium*. Para ello, por un lado, se determinará el efecto de las HHP sobre el microorganismo patógeno y, por otro, el efecto combinado de las HHP con la exposición al antimicrobiano sobre dicho microorganismo. Además, se evaluará el daño subletal producido como consecuencia de los tratamientos y su evolución durante el almacenamiento.



#### **4. Determinar la capacidad antimicrobiana *in vivo* de extractos de coliflor y de espirulina sobre *S. Typhimurium***

La evaluación de la capacidad antimicrobiana *in vivo* de sustancias naturales frente a *S. Typhimurium* con el modelo de *C. elegans* se llevará a cabo en dos etapas. En un primer lugar se estudiará la supervivencia y esperanza de vida de *C. elegans* infectado con *S. Typhimurium* y expuesto a las sustancias naturales en estudio y se compararán con los valores obtenidos para una población control, infectada, pero alimentada con un sustrato de referencia. En segundo lugar, mediante estudios de lisis, se cuantificará la concentración de *S. Typhimurium* en el lumen del nematodo infectado y alimentado con las sustancias antimicrobianas y se comparará con los valores obtenidos para una población control, infectada y alimentada en un medio de referencia.







# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1 Preparación de las sustancias naturales del estudio

Los estudios llevados a cabo en esta tesis se realizaron con distintas sustancias naturales: *Brassica oleracea* var. *botrytis* (coliflor), quitosano procedente de insecto y crustáceo, y espirulina.

El extracto acuoso de coliflor al 3 % (p/v) se preparó a partir de hojas secas de *Brassica oleracea* var. *botrytis* suministradas por TRASA S.L. (España), para lo cual se llevaron a ebullición 1000 mL de agua de peptona al 0,1 % (p/v) y a los que posteriormente se adicionaron 30 g de hojas secas de coliflor, dejándolas en el agua durante 30 minutos para facilitar la extracción de componentes. La infusión se centrifugó a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) y se filtró al vacío con papel Whatman® (90 mm diámetro). El extracto de coliflor se esterilizó por filtración (poro de filtro 0,45µm) antes de utilizarlo en los correspondientes estudios.

El quitosano de crustáceo se obtuvo de Sigma Aldrich® ( $\geq 75\%$  grado de desacetilación, peso molecular = 190-375 kDa) y el quitosano de insecto (*Tenebrio molitor*) se obtuvo de MealFoodEurope S.L. (Doñinos de Salamanca, Salamanca). A partir de las muestras de quitosano comercial descritas anteriormente, se preparó una solución stock de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). El ácido acético al 1% (v/v) se preparó a partir de ácido acético glacial pureza > 99,0 % (Scharlau Chemie, Barcelona, España). La solución stock al 1 % (p/v) de quitosano se esterilizó por filtración (poro de filtro 0,45 µm) antes de utilizarlo en los correspondientes estudios.

La espirulina comercial empleada para los estudios fue *Spirulina Plus* Tabl 150 Stk (Phytopharma S.A., Grandvillard, Suiza). Para la preparación del extracto acuoso de espirulina (10 mg/mL y 100 mg/mL), el preparado en forma de polvo se expuso durante 5 horas a luz UV con el fin de higienizar la muestra. Para favorecer la extracción, el polvo se suspendió en agua destilada estéril a temperatura ambiente a la que se adicionaron perlas de vidrio, sometiendo la mezcla a la acción de un vórtex durante 2 minutos. A continuación se dejó en agitación (150 rpm, 4 °C) durante 12 horas. Posteriormente, el extracto obtenido se centrifugó a 20000 rpm (rotor JA 25.50) (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante se congeló en tubos Falcon a - 40 °C.

## **V.2 Protocolos de reactivación y crecimiento de cepas microbianas**

Los cultivos puros liofilizados de *Listeria monocytogenes* serovar 4b (CECT 4032) (*L. monocytogenes*), *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 5947) (*E. coli*) y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CECT 443) (*S. Typhimurium*) se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Los cultivos liofilizados se rehidrataron en 15 mL de caldo de triptona de soja (TSB) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España), en el caso de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, ó 15 mL de caldo Luria Bertani (LB) (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España), en el caso de *E. coli*. Seguidamente se incubaron en estufa (Memmert®, Schwabach, Alemania) durante 30 minutos a 37 °C, transfiriéndose a 500 mL del medio correspondiente para incubación a 37 °C en baño agitador (Unitronic Orbital C 6001173, J.P. SELECTA S.A, Barcelona, España) a 200 rpm durante toda la noche (aproximadamente 14 horas) para permitir el crecimiento de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli*.



El cultivo obtenido se repartió en tubos de centrifuga y se procedió a su centrifugación a 5000 rpm (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) durante 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y cada pellet se resuspendió con 50 mL de su medio correspondiente. Tras una segunda centrifugación en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 50 mL de medio TSB ó LB estéril. El contenido se repartió en 50 crioviales de 2 mL que contenían 1 mL de TSB ó LB con glicerol al 20 % (viales madre) y se congelaron a -80 °C. La concentración final en cada vial fue de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL. De esta forma se consiguió un stock de los microorganismos de interés para los siguientes estudios.

Para los estudios de capacidad antimicrobiana *in vivo* llevados a cabo con *C. elegans*, el nematodo se alimentó con un cultivo de *E. coli* OP50. La cepa fue proporcionada por el College of Biological Sciences, Minnesota University, USA. Para su mantenimiento y cultivo se procedió como se ha descrito anteriormente para *E. coli* O157:H7.

### **V.3 Técnicas generales de manipulación de *C. elegans***

#### **V.3.1 Cultivo y mantenimiento de *C. elegans* en medio Nematode Growth Media (NGM)**

La cepa salvaje Bristol N2 de *C. elegans* la suministró el College of Biological Sciences, Minnesota University, USA, manteniéndose en el laboratorio en el medio de crecimiento de nematodos (NGM) con un césped de *E. coli* OP50 a una temperatura de 20 °C (Stiernagle, 2006). La manipulación de *C. elegans* se llevó a cabo utilizando un asa de siembra flameada en mechero Bunsen creando un ambiente estéril adecuado para dicha manipulación y observación a través de un microscopio estereoscópico binocular (XTX - 3C, Comecta S.A,

Abrera, Barcelona). Para un correcto mantenimiento de los nematodos estos se transfirieron cada 48 horas a placas nuevas con medio NGM y césped de *E. coli* OP50 que se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 20 °C manteniendo así el stock de *C. elegans* sano.

El medio NGM se preparó añadiendo 3 g de NaCl (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España), 2,5 g de peptona (Peptona bacteriológica, Conda, España) y 17 g de agar bacteriológico (Scharlab Chemie S.A., Barcelona, España) a 975 mL de agua destilada para posterior esterilización por autoclave.

Al medio estéril atemperado se añadieron 1 mL de una disolución de colesterol al 0,5 % (p/v) (Colesterol 95% estabilizado, Acros Organics, Bélgica) preparado en etanol al 96 % a partir de etanol absoluto (Etanol absoluto, Scharlau, Barcelona, España) y esterilizado por filtración, 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (1 M), 1 mL de MgSO<sub>4</sub> (1 M) (Magnesium Sulfate, 99% extra puro, Acros Organics, Bélgica) y 25 mL de solución tampón de fosfato potásico (1M) ajustada a un pH 6. Finalmente, el medio se homogeneizó y se distribuyó en placas Petri de 90 mm x 14,6 mm, empleadas para el mantenimiento de nematodos, y de 60 mm x 15 mm, empleadas para los tratamientos.

### **V.3.2 Preparación de cultivo bacteriano como alimento de *C. elegans* en placa**

Para el mantenimiento del nematodo y como control en los estudios se utilizó un césped de *E. coli* OP50. En los estudios *in vivo*, la capacidad antimicrobiana se determinó frente a *S. Typhimurium* como alimento. Ambos microorganismos se prepararon según lo descrito en el apartado V.2.

A partir de los cultivos glicerizados y en las placas preparadas con medio de

mantenimiento se realizó una siembra en superficie de *E. coli* OP50 ó de *S. Typhimurium* (según el tipo de estudio) y se incubaron a 37 °C en estufa (Memmert®, Schwabach, Alemania) durante toda la noche con el objetivo de obtener un césped de *E. coli* ó de *S. Typhimurium* que permitiera la alimentación *ad libitum* de los nematodos. Posteriormente, las placas se almacenaron a 4 °C hasta uso.

### **V.3.3 Sincronización de *C. elegans***

Todos los estudios que involucraron el uso de *C. elegans* se llevaron a cabo con nematodos sincronizados, es decir, en el mismo estado de desarrollo (gusanos adultos jóvenes).

Para ello, 20 gusanos *C. elegans* en estado larvario L4 procedentes de placas de NGM con medio de alimentación *E. coli* OP50 (90 mm x 14.6 mm) se incubaron en placas nuevas con el mismo medio durante toda la noche a 20 °C con el fin de obtener una puesta de huevos. Al día siguiente, los 20 gusanos iniciales se extrajeron de las placas incubadas, las cuales se volvieron a incubar a 20 °C aproximadamente 48-72 horas. Pasado este tiempo se obtuvieron gusanos adultos jóvenes sincronizados para iniciar los estudios.

### **V.3.4 Estudios de supervivencia y esperanza de vida**

Estos estudios se realizaron con una población de 250 gusanos por tratamiento. Se colocaron 10 gusanos sincronizados por placa según el correspondiente grupo de estudio, incubándose a 20 °C. Cada 48 ó 72 horas se contabilizaron los gusanos vivos, muertos y censurados hasta la muerte de la totalidad de los gusanos de cada placa, traspasando a placas con alimento renovado únicamente aquellos que continuaron vivos. Se consideraron como censurados

aquellos gusanos que murieron durante la manipulación, y muertos aquellos sin movimiento o sin respuesta ante la estimulación.

### **V.3.5 Estudios de puesta de huevos**

Los estudios se llevaron a cabo con 25 gusanos por tratamiento. Para dichos estudios de puesta de huevos se asignó un gusano sincronizado por placa de tratamiento y se incubó a 20 °C durante 48 ó 72 horas. Pasado este tiempo, se contabilizó la progenie (huevos y larvas) de cada gusano sincronizado y posteriormente este se traspasó a placas nuevas del tratamiento correspondiente, repitiendo el conteo cada 48 ó 72 horas hasta la muerte del nematodo. En el caso de que el gusano estuviera muerto, únicamente se realizó el conteo de progenie y concluyó su seguimiento. Se consideraron como censurados aquellos gusanos que murieron durante la manipulación.

### **V.4 Materiales y métodos para determinar la capacidad antimicrobiana *in vivo***

Los estudios *in vivo* para determinar el efecto de extractos de coliflor, espirulina o quitosano se han llevado a cabo mediante *C. elegans*, como organismo modelo. En primer lugar, se pretende determinar si dichas sustancias, administradas en las concentraciones con efecto antimicrobiano *in vitro*, son tóxicas para *C. elegans*. Posteriormente, si las sustancias no son tóxicas, se procede al estudio del efecto antimicrobiano en *C. elegans* infectado por *Salmonella* Typhimurium.

#### **V.4.1 Evaluación del efecto de sustancias naturales sobre *C. elegans***

El estudio del efecto de las sustancias naturales, en las concentraciones que tienen actividad antimicrobiana, sobre *C. elegans*, se basó en evaluar la supervivencia, esperanza de vida y la pauta de puesta de huevos de una población sana, expuesta a dichas sustancias naturales, frente a una población control. Los estudios se llevaron a cabo según los protocolos descritos en los apartados V.3.4 y V.3.5. La población control se alimentó con NGM mientras que la muestra se alimentó con NGM al que se le adicionó cada una de las sustancias naturales preparadas según se describe en el apartado V.4.1.1.

##### **V.4.1.1 Preparación de medio NGM con las diferentes sustancias naturales**

El medio NGM con extracto de coliflor al 3% (Sanz-Puig, 2017) se preparó con los mismos componentes usados para la elaboración del medio NGM pero sustituyendo 975 mL de volumen de agua destilada que se añadían al preparar el medio NGM, por el extracto al 3% filtrado. El medio atemperado se distribuyó en placas 60 mm x 15 mm.

Para la preparación del medio NGM con quitosano de crustáceo o insecto al 0,15% (p/v) cada placa de NGM con césped de *E. coli* OP50 (60 mm x 15 mm) destinada a los tratamientos con quitosano de crustáceo ó insecto se recubrieron con el correspondiente volumen de una disolución stock al 1 % (p/v) de quitosano en 1 % (v/v) de ácido acético para alcanzar una concentración final de 0,15 % (p/v) de quitosano. La extensión de cada disolución de quitosano (insecto y crustáceo) por toda la superficie de la placa se realizó con asa de

Digralsky, y una vez se absorbió la capa formada, las placas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Además, para comprobar si los efectos producidos en los parámetros fisiológicos estudiados en *C. elegans* fueron debidos únicamente al quitosano y no al ácido acético, se incluyeron placas de NGM con césped de *E. coli* OP50 y ácido acético como controles ácidos. El volumen de ácido acético añadido fue el mismo que el añadido a las placas de NGM con césped de *E. coli* OP50 (60 mm x 15 mm) tal como se ha descrito en el párrafo anterior (Preparación de medio NGM con quitosano al 0,15 % (p/v)). La extensión de la disolución por toda la superficie de la placa se realizó con asa de Digralsky, y una vez se absorbió la capa formada, las placas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para conseguir la concentración final deseada de espirulina en el medio NGM (1mg/mL), de la solución stock de 10 mg/mL se utilizaron 100 mL de extracto de espirulina por cada litro de medio NGM a preparar para los tratamientos. El medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) se preparó incorporando el extracto de espirulina preparado según lo descrito en el apartado V.1. El extracto se descongeló y se incorporó al medio NGM. Seguidamente se distribuyó en placas Petri (60 mm x 15 mm) que una vez solidificadas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

#### **V.4.1.2 Grupos de estudio**

En la tabla V.1. se describen los grupos de población de *C.elegans* empleados en el estudio del efecto de las sustancias naturales sobre el nematodo. En este estudio todos los grupos se alimentaron con *E. coli* OP50 (EC).

**Tabla V.1.** Grupos de estudio empleados en la evaluación del efecto de sustancias naturales sobre *C. elegans* en función del tipo de medio con el que fueron alimentados.

ESTUDIO	CONTROL	MUESTRA
<i>Brassica</i> (CL)	EC: NGM	EC-CL: NGM + extracto coliflor 3%
Quitosano (QC/QI)	EC: NGM EC-AC: NGM + Ác.Acético	EC-AC-QC: NGM + quitosanocrustáceo 0,15% EC-AC-QI: NGM + quitosanoinsecto 0,15%
Espirulina (SP)	EC: NGM	EC-SP: NGM + espirulina 0,1 %

#### V.4.2 Determinación de la capacidad antimicrobiana *in vivo*

##### V.4.2.1 Estudios de supervivencia y esperanza de vida para determinar la capacidad antimicrobiana

Los estudios de supervivencia y esperanza de vida se realizaron según lo descrito en el apartado V.3.4 pero infectando la población de *C. elegans* con *S. Typhimurium*, es decir, exponiendo los nematodos a *S. Typhimurium* (ST) en vez de *E. coli* OP50 con el fin de provocar una infección.

**Tabla V.2.** Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de los cambios en la supervivencia de *C. elegans*.

ESTUDIO	CONTROL	MUESTRA
<i>Brassica</i> (CL)	EC: NGM + <i>E. coli</i> OP50	ST: NGM + <i>S. Typhimurium</i> ST-CL: NGM + extracto coliflor 3 % + <i>S. Typhimurium</i>
Espirulina (SP)	EC: NGM + <i>E. coli</i> OP50	ST: NGM + <i>S. Typhimurium</i> ST-SP: NGM + espirulina 0,1% + <i>S. Typhimurium</i>

### V.4.2.2 Estudios de lisis de *C. elegans* para determinar la capacidad antimicrobiana

**Tabla V.3.** Grupos de estudio empleados en la evaluación de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales a partir de la lisis de *C. elegans*.

ESTUDIO	CONTROL	MUESTRA
<i>Brassica</i>	L-ST: NGM + <i>S. Typhimurium</i>	L-ST-CL: NGM + <i>S. Typhimurium</i> + extracto coliflor 3%
Espirulina	L-ST: NGM + <i>S. Typhimurium</i>	L-ST-SP: NGM + <i>S. Typhimurium</i> + espirulina 0,1%

**Efecto antimicrobiano de *Brassica oleracea* var. *botrytis* o espirulina frente a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* en el intestino de *C. elegans***

Tras analizar la esperanza de vida de los nematodos *C. elegans* infectados y expuestos al extracto de coliflor o extracto de espirulina, se decidió proseguir con un estudio de cuantificación de células de *S. Typhimurium* en el tracto digestivo de los nematodos tras su exposición a dichos extractos.

La metodología asociada a este estudio se describe en los apartados generales de mantenimiento de *C. elegans* (V.3.1, V.3.2 y V.3.3), y la preparación del medio NGM con extracto de coliflor al 3% o con extracto de espirulina en el apartado V.4.1.1.

#### **Lisis de *C. elegans***

El estudio de la evolución de la infección de *C. elegans* por *S. Typhimurium* en el tracto digestivo se realizó en gusanos sincronizados a las 24, 48 y 96 horas



post-infección en el trabajo con extracto de coliflor, y sólo hasta las 48 horas post-infección en el trabajo con extracto de espirulina.

Para el presente trabajo se emplearon 45 nematodos sincronizados en medio de mantenimiento NGM con césped de *E. coli* OP50 a 20 °C desde donde se transfirieron individualmente a placas de NGM con césped de *S. Typhimurium*. Tras 24 horas de infección con *S. Typhimurium* a 20 °C, un grupo de 15 nematodos se reservaron para cuantificar la cantidad inicial de *S. Typhimurium* en el tracto digestivo de *C. elegans* ( $t_0 = 0$  horas), y el resto de gusanos fueron asignados al grupo control (L-ST) ó al tratamiento (extracto de coliflor (L-ST-CL) y/o espirulina (L-ST-SP)). Los nematodos se lisaron tras 24, 48 y 96 horas de exposición al extracto de coliflor y tras 48 horas de exposición al extracto de espirulina, contándose la concentración de *S. Typhimurium* tanto en el lisado de las muestras control, como en las expuestas durante diferentes tiempos a los antimicrobianos naturales. Se cuantificó la capacidad antimicrobiana de cada compuesto en función de las reducciones logarítmicas alcanzadas en la concentración de *S. Typhimurium* para los diferentes tiempos de exposición. Se realizaron 2 repeticiones por cada tratamiento y tiempo  $t_x$ , cada repetición con 30 placas con 1 nematodo por placa, de forma que el tamaño muestral para el grupo control o tratamiento fue de 60 nematodos para cada tiempo ( $t_x$ ) y 30 nematodos para el blanco ( $t_0$ ).

Previamente al proceso de lisis, se elaboró medio M9 autoclavando 78 mL de agua destilada a la que se adicionaron posteriormente 10  $\mu$ l de una disolución estéril de  $\text{CaCl}_2$  (1 M) y 200  $\mu$ l de una disolución estéril de  $\text{MgSO}_4$  (1 M). También se le añadieron 2 mL de una disolución de glucosa al 20 % (Glucosa anhidra, Scharlau, Barcelona, España) esterilizada por filtración (filtro de jeringa de PVDF de 0,45 $\mu$ m) manteniendo las condiciones de esterilidad.

El proceso de lisis consistió en trasladar, mediante asa bacteriológica, 5 nematodos infectados a placas con medio NGM estéril (1 nematodo por placa) donde se lavaron dos veces con 10  $\mu$ l de medio M9. Los nematodos lavados se transfirieron a un tubo de 5 mL que contenía 1 mL de M9 con Tritón X-100 al 1% (Tritón TM X-100, Sigma-Aldrich, USA), y se lisaron usando un homogeneizador manual TissueRuptor I (Qiagen) a velocidad media durante 20 segundos (Figura V.1). Se prepararon diluciones seriadas del lisado de *C. elegans* en agua de peptona al 0,1% y se incubaron en medio Eosine Methylene Blue Agar (EMB agar) durante 48 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación se procedió al recuento de colonias presuntivas de *Salmonella* (ausencia de coloración en medio EMB) y se expresaron como UFC/mL.

Los resultados de los recuentos se expresaron como  $\log_{10} (N/N_0)$ , siendo  $N_0$  el promedio de la carga microbiana a  $t_0= 0$  horas, y  $N$  el promedio de la carga microbiana a  $t_1= 24$  horas,  $t_2 = 48$  horas y  $t_3 = 96$  horas en el estudio con extracto de coliflor, ó  $t_1= 48$  horas en el estudio con extracto de espirulina.

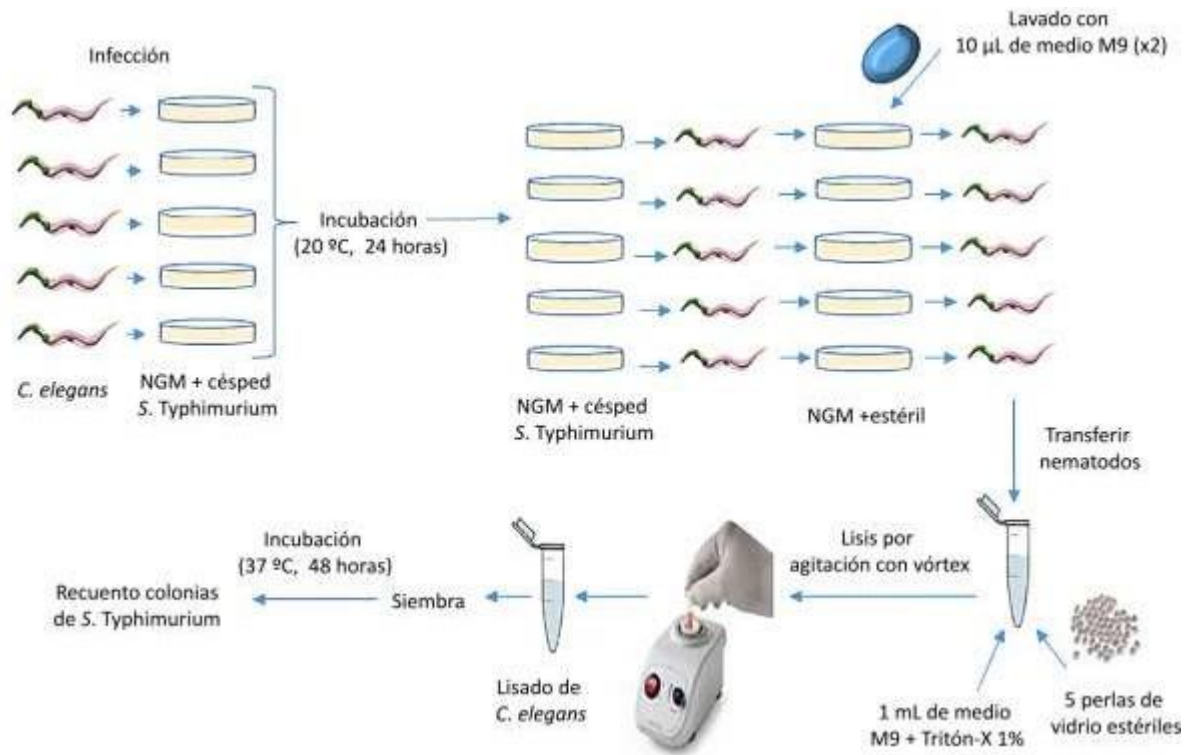


Figura V.1. Procedimiento de obtención de lisis de *C. elegans*.

## **V.5 Materiales y métodos para determinar la capacidad antimicrobiana *in vitro***

Para aquellas sustancias naturales en las que se vió que no era posible llevar a cabo estudios *in vivo* con *C. elegans* por presentar efectos negativos sobre el nematodo, se optó por realizar estudios de capacidad antimicrobiana *in vitro*.

La preparación de los cultivos de microorganismos para los estudios *in vitro* de capacidad antimicrobiana del quitosano de crustáceo (QC) y de insecto (QI) se llevó a cabo tal como se describe en la sección V.2 del presente documento.

### **V.5.1 Preparación de solución de quitosano de crustáceo y de insecto**

Partiendo de la disolución stock al 1 % (p/v) de quitosano descrita en el apartado V.1, se preparó una concentración 0,15% (p/v) de quitosano en medios estériles TSB (para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*) ó LB (para *E. coli*). Adicionalmente se prepararon controles ácidos (AC) con el mismo volumen de ácido acético empleado en las disoluciones al 0,15 % (p/v) de quitosano para conocer el posible efecto antimicrobiano del ácido acético, así como también se prepararon controles sin ácido acético (C). El pH del medio de cultivo sin acidificar (C) fue de  $7,3 \pm 0,2$ , y el valor de pH de los controles acidificados (AC) y los medios con quitosano (QC y QI) fue el mismo, ajustándose a los pH de estudio ( $6,2 \pm 0,2$  y  $5,0 \pm 0,2$ ). En el caso del estudio del efecto antimicrobiano del quitosano combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP), el estudio se realizó a pH 6,2 ya que fue el que menor inhibición produjo en *Salmonella* y se consideró interesante para ver el efecto conjunto quitosano-HHP.

### **V.5.2 Evaluación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de una solución de quitosano de crustáceo y de insecto frente a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium***

El estudio consistió en observar diferencias en cuanto a la capacidad de crecimiento de *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* al ser expuestos a distintas fuentes de quitosano (crustáceo e insecto) empleando distintas concentraciones de inóculo ( $10^3$  UFC/mL y  $10^6$  UFC/mL) a distintos valores de pH (5,0 y 6,2).

A partir de los crioviales de los microorganismos ( $10^8$ - $10^9$  UFC/mL) se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1 % (p/v) hasta conseguir una concentración de inóculo de  $10^3$  UFC/mL ó  $10^6$  UFC/mL en el correspondiente medio (control, control acidificado y disoluciones de quitosano al 0,15 % (p/v)). Inmediatamente después de la inoculación, ( $t_0 = 0$  horas), se tomó una muestra y se incubó en agitación continua a 250 rpm a 37 °C. Posteriormente se tomaron muestras a distintos tiempos (3, 6, 8, 24 y 49 horas). La población microbiana (UFC/mL) del medio inoculado se determinó mediante siembra en profundidad de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% (p/v) en medio agar triptona- soja (TSA), en el caso de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, y en medio agar de Luria Bertani (LBA) en el caso *Escherichia coli* O157:H7. El recuento microbiano (UFC/mL) se realizó tras la incubación de los microorganismos a 37 °C durante 24 horas (*E. coli* O157:H7 y *S. Typhimurium*) y 48 horas (*L. monocytogenes*), y los resultados se expresaron como el logaritmo del cociente de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) entre el valor de la concentración inicial ( $t = 0$  h) ( $N_0$ ). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

### **V.5.3 Evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* de quitosano combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a *S. Typhimurium***

Para estudiar el efecto combinado del quitosano con la alta presión hidrostática, se procedió a inocular los tubos de muestra del grupo control, control acidificado y soluciones de quitosano al 0,15 % (p/v) a partir de crioviales de *S. Typhimurium* con una concentración entre  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL hasta alcanzar una concentración  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL con la cual comenzar el estudio. El equipo de altas presiones EPSI NV (Temse, Bélgica) permitió aplicar distintas condiciones de presiones a las muestras, 300 MPa durante 2 minutos ó bien 450 MPa durante 2 minutos, ambos a 25 °C. Tras el tratamiento, se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% (p/v) de los medios tratados y se procedió a la siembra en TSA, incubación a 37 °C durante 24 horas y posterior recuento microbiano (UFC/mL). Con el objetivo de conocer el efecto de las altas presiones sobre el microorganismo patógeno, se tomó una muestra de la carga microbiana viable presente en los medios recién inoculados previo tratamiento de altas presiones ( $N_i$ ) y posterior a dicho tratamiento ( $N_0$ ), obteniendo las reducciones logarítmicas de la carga microbiana debidas únicamente al tratamiento HHP mediante la fórmula  $\log_{10}(N_i/N_0)$ . Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento con 4 placas por repetición.

### **V.5.4 Evaluación del daño celular**

El daño subletal es un fenómeno que se conoce desde hace tiempo pero que se ha acentuado como consecuencia de los procesos de conservación térmicos y no térmicos mínimos que se han venido desarrollando en los últimos años. La

presencia de células dañadas subletalmente puede llegar a comprometer la inocuidad de los alimentos, e incluso considerarse como un riesgo emergente. Es por ello que se ha incluido esta sección en la presente tesis doctoral.

Para ello, se determinó el daño y la muerte celular de *S. Typhimurium* tanto en los experimentos de evaluación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de una solución de quitosano de crustáceo y de insecto frente a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (sección V.5.2), como en la evaluación del efecto antimicrobiano de quitosano *in vitro* combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a *S. Typhimurium* (sección V.5.3). El procedimiento de dilución y siembra para cuantificar el daño celular en las muestras fue el mismo que el descrito en las secciones V.5.2 y V.5.3, pero usando además de un medio no selectivo (TSA) donde crecen las células viables (dañadas + intactas), un medio selectivo (TSA con adición del 3 % de NaCl) donde se contabilizaron las células intactas (Sanz-Puig, 2017). La incubación del microorganismo en el medio con sal fue de 48 horas a 37 °C, y tras este periodo se realizó el recuento de colonias bacterianas. Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento con 4 placas por repetición.

Las siguientes ecuaciones se aplicaron para la determinación del daño y la muerte celular de *S. Typhimurium*:

$$\text{Células muertas} = \log_{10} \left( \frac{\frac{UFC}{mL} \text{ medio no selectivo } t2}{\frac{UFC}{mL} \text{ medio no selectivo } t1} \right)$$

$$\text{Células dañadas} = \log_{10} \left( \frac{\frac{UFC}{mL} \text{ medio no selectivo}}{\frac{UFC}{mL} \text{ medio selectivo}} \right)$$

Medio selectivo (TSA con adición de 3% NaCl)

Medio no selectivo (TSA)

t= tiempo (horas)

## V.6 Análisis estadístico

Los resultados de los estudios *in vivo* e *in vitro* se analizaron mediante el programa IBM SPSS Statistics 19 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.)

Dado que los datos de supervivencia y censura de esta tesis se recogieron por intervalos de tiempo, se estimó la proporción de la población que sobrevivió determinados periodos de tiempo, teniendo en cuenta aquellos casos censurados que fueron eliminados del estudio por manipulación antes de llegar a morir de forma natural. De esta manera, el tratamiento de los datos de supervivencia de *C. elegans* se llevó a cabo mediante el método de Kaplan-Meier por intervalos para obtener las funciones estimadas de supervivencia, los percentiles estimados para la distribución de supervivencia (percentiles 25, 50 y 75), y las funciones de riesgo acumulado de *C. elegans*.



La función de supervivencia,  $S(t)$  es la probabilidad de que el sujeto sobreviva más allá del instante  $(t)$ .

$$S(t) = P(T > t), t \geq 0$$

$$S(t) = 1 - F(t)$$

donde “ $T$ ” es una variable aleatoria de tiempo, “ $t$ ” es un valor de  $T$  determinado, y “ $F(t)$ ” es la función de distribución de  $T$ .

La función de riesgo  $r(t)$  o tasa de fallo se define como el cociente entre la función densidad  $(t)$  y la función supervivencia  $(t)$  e indica la disposición inmediata al fallo en un intervalo de tiempo pequeño.

$$r(t) = \frac{f(t)}{S(t)}$$

El tratamiento estadístico de los datos consistió en realizar pruebas de contraste de hipótesis para comparar la igualdad de las distribuciones de supervivencia de las distintas poblaciones mediante los siguientes test (Karadeniz & Ercan, 2017):

- Log-Rank (test de Mantel Haenszel): los puntos de tiempo se ponderan por igual en esta prueba. Es el test más potente pero sólo si las diferencias entre las curvas de supervivencia son proporcionales. No detecta adecuadamente las diferencias entre las distintas curvas que ocurren al principio o al final del periodo de estudio.
- Gehan-Breslow-Wilcoxon: los puntos de tiempo se ponderan por el número de casos en riesgo en cada momento, y por eso detecta mejor las diferencias entre curvas cuando estas se cruzan o cortan al principio del periodo de estudio, es decir, cuando el número de casos en riesgo es mayor.

- Tarone-Ware: los puntos de tiempo se ponderan por la raíz cuadrada del número de casos en riesgo en cada momento. Es un test intermedio a los anteriores, y detecta mejor las diferencias entre curvas al principio del seguimiento, aunque no tanto como el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Respecto a la puesta de huevos, se calculó el promedio de huevos puestos para cada población, y se analizaron las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de t-student (2 tratamientos), ó bien análisis de la varianza (ANOVA) (más de 2 tratamientos) con test post-hoc para determinar las diferencias entre dos o más grupos tras obtener  $p \leq 0,05$  en ANOVA, en concreto, el test de la Diferencia Significativa Honesta de Tukey (HSD de Tukey). En caso requerido, se aplicaron tests no paramétricos. Las diferencias entre tratamientos de los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia también se analizaron con estas pruebas.

Los resultados de los datos experimentales obtenidos tras el recuento de células de *Salmonella* en *C. elegans* infectados y alimentados con y sin extracto de coliflor o de espirulina fueron expresados como  $\log_{10} (N/N_0)$  y se analizaron mediante test-t para determinar la existencia de diferencias entre grupos ( $p \leq 0,05$ ).

Los recuentos bacterianos (UFC/mL) del estudio de evaluación de la capacidad antimicrobiana de las soluciones de quitosano de crustáceo (QC) y de insecto (QI) al 0,15 % (p/v) se expresaron como  $\log_{10} (N/N_0)$  y se representaron frente al tiempo. Las diferencias entre distintos grupos con la misma concentración inicial de inóculo e igual valor de pH a las 8 horas post-inoculación ( $t= 8$  horas) fueron determinados mediante ANOVA ( $p \leq 0,05$ ), seguido de un análisis post-hoc de Tukey. Este tiempo se eligió como representativo de las mayores

diferencias en cuanto a tendencias de crecimiento ó muerte microbiana en los distintos grupos.

Respecto al estudio de evaluación del efecto del quitosano combinado con tratamiento de altas presiones hidrostáticas (HHP), las diferencias entre los distintos grupos de tratamiento y tiempo se determinaron mediante ANOVA tras la transformación logarítmica de los resultados (UFC/mL), y para determinar los grupos distintos entre sí se empleó el test post-hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0,05$ .







# ***RESULTADOS***

---





## VI. RESULTADOS

---

### *Capítulo 1: Efecto de extractos de coliflor, espirulina y soluciones de quitosano sobre C. elegans*

---

#### VI.1.1 Introducción

La necesidad de avanzar hacia una economía circular está llevando a explorar la valorización de residuos de la industria y nuevas fuentes de nutrientes más respetuosas con el medio ambiente. Esta tesis quiere aportar información nueva al respecto, considerando la valorización de residuos de plantas y animales y extractos de algas como compuestos con actividad antimicrobiana.

Una forma de evaluar el efecto antimicrobiano de estas sustancias, es ver su eficacia *in vivo* en un organismo que pueda ser modelo para estos fines concretos. El organismo modelo elegido para los estudios *in vivo* de esta tesis ha sido el nematodo *C. elegans* por sus ventajas a nivel de laboratorio como son, su fácil manipulación, corto ciclo de vida y compartir gran cantidad de genes y procesos fisiológicos con mamíferos. Este nematodo ya se ha utilizado como modelo en estudios de obesidad, desarrollo, senescencia, actividad motora y enfermedades neurodegenerativas entre otros (Shen et al., 2018). Sin embargo, para poder utilizar a *C. elegans* como modelo para evaluar la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales, es necesario averiguar, en primer lugar, hasta qué punto dichas sustancias administradas a las

concentraciones que desarrollan su capacidad antimicrobiana, pueden ser dañinas para el nematodo.

En concreto, en este capítulo se describen los efectos de soluciones de quitosano al 0,15%, un extracto de coliflor al 3% y un extracto de espirulina al 0,1% en la supervivencia y esperanza de vida, así como en la pauta de puesta de huevos como indicadores del impacto que pudieran tener estas sustancias en *C. elegans*.

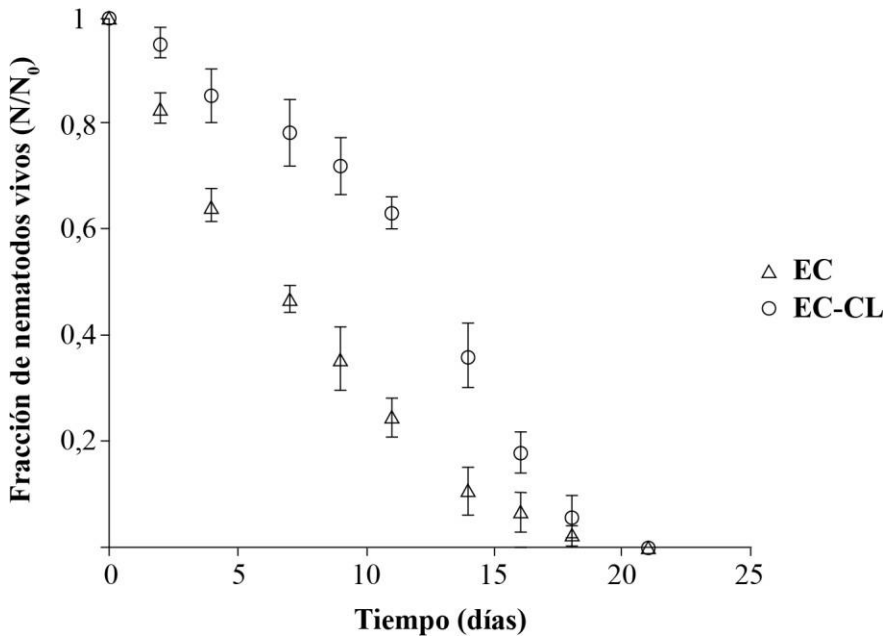
## **VI.1.2 Resultados y discusión**

A continuación se detallan los efectos producidos tanto en la supervivencia y esperanza de vida, como en la pauta de puesta de huevos de *C. elegans* para cada una de las sustancias naturales estudiadas.

### **VI.1.2.1 Efecto de extracto de coliflor al 3% (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida, y pauta de puesta de huevos de *C. elegans***

El estudio se llevó a cabo sobre los grupos de población de nematodos descritos en la tabla V.1.

La figura VI.1.1 muestra la fracción de supervivientes de *C. elegans* ( $N/N_0$ ) a lo largo del tiempo para cada población en estudio. Desde el día 2 hasta el final del estudio, la fracción de supervivientes alimentados con *E. coli* OP50 en medio con extracto de coliflor (EC-CL) fue mayor que para los nematodos alimentados únicamente con *E. coli* OP50 (grupo control) (EC).

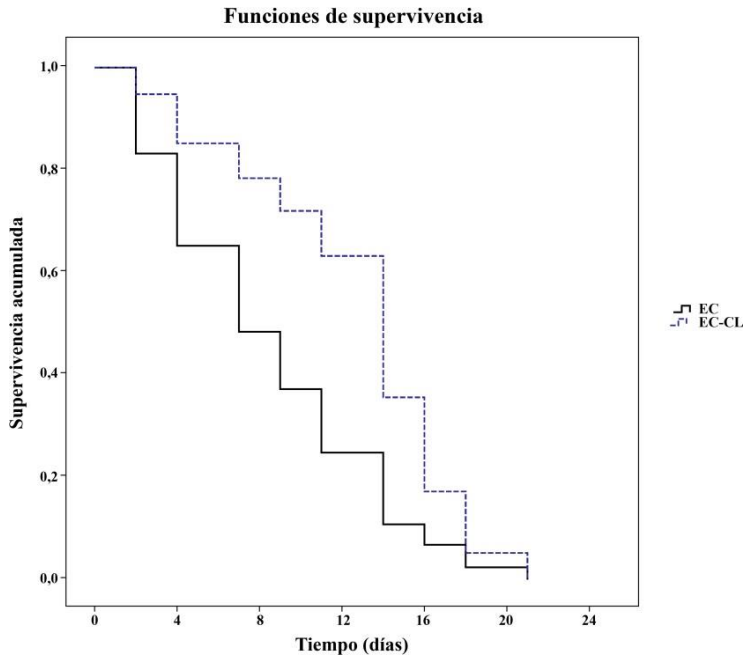


EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

EC-CL: *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) alimentados con *E. coli* OP50

**Figura VI.1.1.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* para las dos poblaciones consideradas en el estudio con extracto de coliflor. Cada punto representa el promedio de la fracción de nematodos vivos a ese tiempo  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

Los datos de supervivencia se analizaron mediante el modelo Kaplan Meier por intervalos, lo que permitió obtener los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de los nematodos (Tabla VI.1.2) y las funciones de supervivencia (Figura VI.1.2) y de riesgo (Figura VI.1.3).



**Figura VI.1.2.** Funciones estimadas de supervivencia de las poblaciones del estudio con extracto de coliflor.

La figura VI.1.2 muestra la probabilidad de los nematodos de sobrevivir en función de la alimentación (sin o con extracto de coliflor) a lo largo de su vida. En general, se observó una mayor supervivencia para cada intervalo de tiempo de los nematodos alimentados con extracto de coliflor, y a partir del día 18, las funciones de supervivencia para los dos grupos están muy próximas. Hay que hacer notar que en este momento *C. elegans* se encuentra en la etapa de senescencia. Para demostrar posibles diferencias entre las funciones de supervivencia se realizaron los test recogidos en la tabla VI.1.1

**Tabla VI.1.1.** Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor.

TEST	ESTADÍSTICO ( $\chi^2$ )	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR*
Log-Rank	63,6	1	< 0,001
Breslow	73,8	1	< 0,001
Tarone-Ware	72,7	1	< 0,001

\*Las funciones de supervivencia de cada test fueron significativamente distintas si  $p \leq 0,05$

El test de Breslow detectó que el grupo de nematodos alimentados con extracto de coliflor sobrevivieron significativamente más días que los no alimentados con dicho extracto ( $\chi^2 = 73,8$ , grados de libertad = 1,  $p < 0,001$ ) (Tabla VI.1.1).

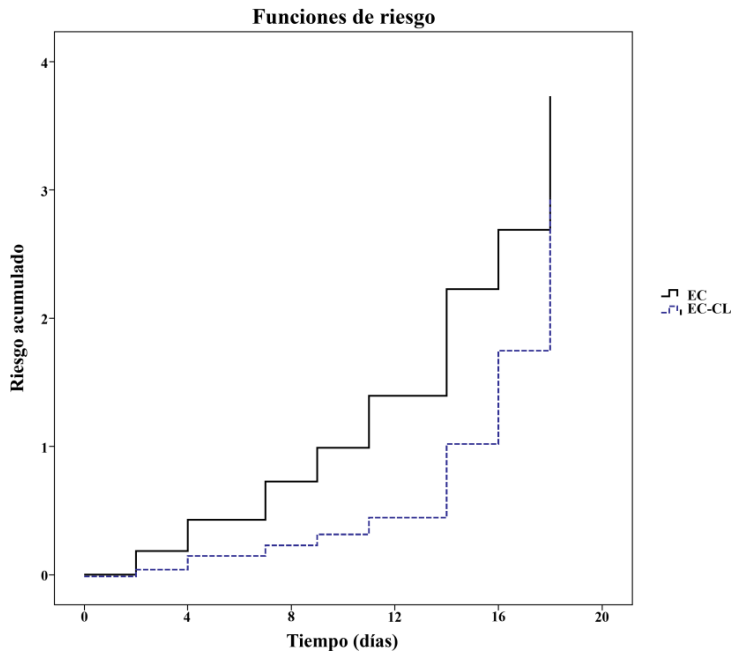
La tabla VI.1.2 muestra los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de los nematodos obtenidos mediante el análisis de Kaplan Meier. Como se puede apreciar, el 50% de los nematodos alimentados con 3% de extracto de coliflor (EC-CL) sobrevivieron 12,4 días, mientras que en el grupo control (EC), el 50% de los gusanos sobrevivieron 6,9 días.

**Tabla VI.1.2.** Prueba t-student realizada para los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de *C. elegans* de los grupos considerados en el estudio con extracto de coliflor.

PERCENTIL (%)	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DÍAS ± ERROR ESTÁNDAR)	
	EC	EC-CL
75	2,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	7,8 ± 2,0 <sup>b</sup>
50	6,9 ± 1,8 <sup>a</sup>	12,4 ± 1,1 <sup>b</sup>
25	11,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,0 <sup>b</sup>

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p \leq 0,05$ )

El gráfico de funciones de riesgo para este estudio se muestra a continuación.



**Figura VI.1.3.** Funciones estimadas de riesgo acumulado de las distintas poblaciones del estudio con extracto de coliflor.

La figura VI.1.3 muestra las funciones estimadas de riesgo acumulado. La función de riesgo marca la dinámica del proceso estudiado, al dar sus valores una adecuada aproximación a la tasa de incidencia del evento de interés (muerte). En dicha figura se aprecia que el número de individuos en riesgo de morir aumenta mayormente a partir del día 14 para la población alimentada con extracto de coliflor, siendo esta población la de menor riesgo de morir en un momento dado, lo cual se corresponde con los resultados de la curva de supervivencia.

Hay estudios que indican que varios extractos de fuentes naturales prolongan la esperanza de vida de *C. elegans* (Duran et al., 2019; Rangsinth et al., 2019, H. Wang et al., 2018; J. Wang et al., 2020). Extractos de plantas como



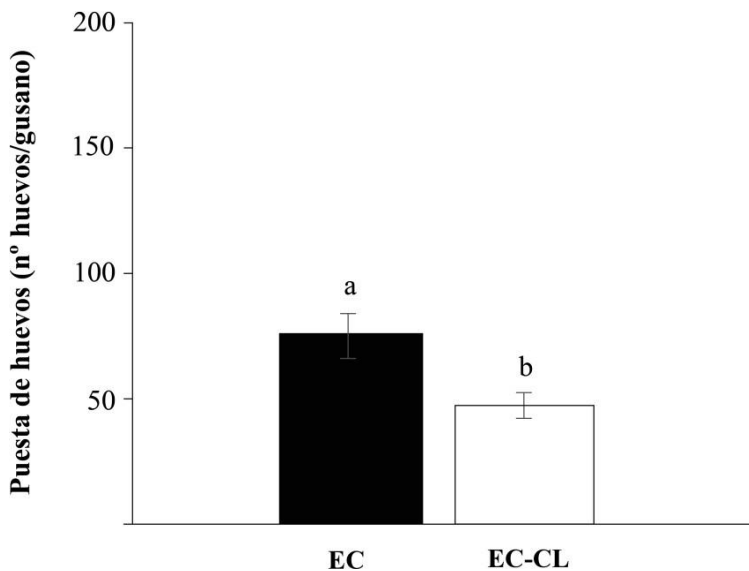
*Caesalpinia mimosoides* han producido un aumento en su esperanza de vida del 4,35% (Rangsinth et al., 2019), porcentaje que se incrementa en el caso de extractos de entre 100 y 400 mg/mL de naranja, con un aumento de supervivencia del 10 al 26,2% (J. Wang et al., 2020) y de hasta el 44,4 % en el caso de extractos de arándanos (H. Wang et al., 2018).

Duran et al. (2019) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de extractos de uva sobre la esperanza de vida de *C. elegans*. Se consiguieron resultados de supervivencia máxima de 19,5 días en *C. elegans* L2 cuando se alimentaron con una concentración de extracto de 250 µg/mL (6,70 µg/placa de ácido gálico) comparado con 17,7 días en el grupo control. Por otro lado, la alimentación de los nematodos L3 con 100 µg/mL de extracto de uva, con un contenido en ácido gálico de 7,13 µg/placa, resultó en una supervivencia máxima de 19,1 días, siendo este valor también mayor que la supervivencia para el grupo control. Otros autores corroboran el efecto positivo del ácido gálico, la catequina, y ácido clorogénico, sobre la esperanza de vida de *C. elegans*, polifenoles que se encuentran también en la coliflor (Saul et al., 2011; Zheng et al., 2016). Sin embargo, otros polifenoles (Saul et al., 2011) y extractos (Guha et al., 2012) muestran ese mismo comportamiento a bajas concentraciones pero reducen la supervivencia conforme se aproximan a un nivel de concentraciones más altas.

De acuerdo a los trabajos mencionados, podemos decir que es relativamente frecuente que los extractos de plantas mejoren la supervivencia o alarguen la esperanza de vida del nematodo. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio en relación al extracto de coliflor, contribuyen a afianzar este efecto positivo de algunos componentes de los extractos de plantas. Por lo tanto, podemos decir que, además del posible efecto antimicrobiano, tal como se estudiará en posteriores capítulos, puede haber un efecto beneficioso en

los seres vivos al consumir este tipo de extractos de coliflor, lo que contribuiría a su valoración.

Otro estimador del efecto de los antimicrobianos naturales y de la infección sobre *C. elegans* puede ser la pauta de puesta de huevos. Este parámetro es muy sensible a los efectos de los microorganismos patógenos y compuestos químicos (Silva et al., 2015). La figura VI.1.4 muestra el número de huevos puestos por las dos poblaciones del estudio.



**Figura VI.1.4.** Promedio de puesta de huevos de *C. elegans* alimentados sin y con extracto de coliflor (promedio (n° huevos/gusano)  $\pm$  desviación estándar (barras de error)).

La figura VI.1.4 representa la puesta promedio de huevos por cada *C. elegans* hasta el final de su vida en las distintas condiciones del estudio. Según la prueba t-student, los nematodos que se han alimentado en un medio NGM sin suplementar con extracto de coliflor pusieron más huevos que aquellos

alimentados con extracto de coliflor, por lo que podría indicar un impacto negativo en la puesta de huevos de los nematodos expuestos al extracto ( $p \leq 0,05$ ).

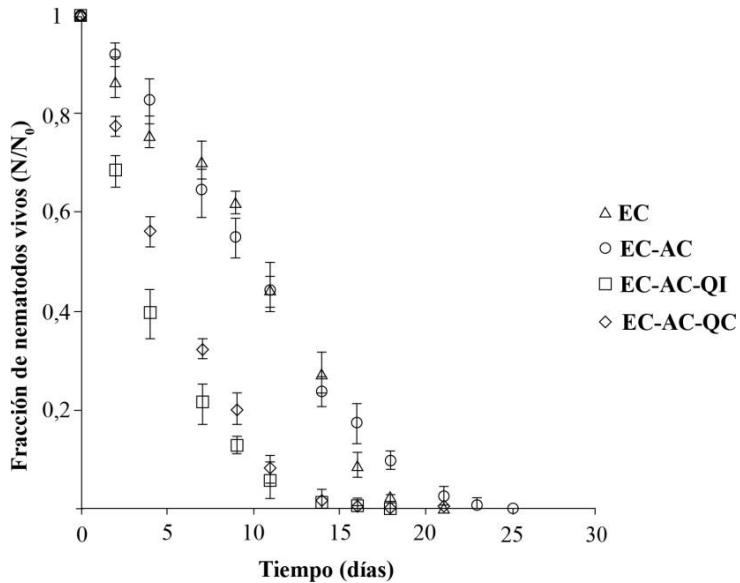
Se han publicado estudios de la puesta de huevos de *C. elegans* expuesto a polifenoles de la coliflor como catequina, quercetina y rutina. En el trabajo de Arroyo-López (2020), tanto la quercetina como la rutina aumentaron la capacidad reproductiva, expresada como incremento en el número de huevos. Por el contrario, la catequina, disminuyó un 15% el número de huevos puestos por el nematodo respecto al control, mientras que otros autores han publicado una ausencia del efecto de dicha sustancia a concentraciones de 200  $\mu\text{M}$  (Saul et al., 2009; Surco-Laos et al., 2012).

La presencia de extracto de coliflor en el medio de alimentación aumenta la supervivencia del nematodo para cada intervalo de tiempo estudiado. Estos resultados parecen indicar que el extracto de coliflor, en las condiciones del estudio, no tiene un efecto dañino para el nematodo, es más, parece que mejora la calidad de vida de la población de nematodos estudiada aún cuando afecta a la reproducción. En consecuencia, es factible utilizar *C. elegans* en estudios de capacidad antimicrobiana del extracto de coliflor sobre *Salmonella*, utilizando así el nematodo como organismo modelo en estudios de infección.

#### **VI.1.2.2 Efecto de soluciones de quitosano de crustáceo e insecto al 0,15 % (p/v) en la supervivencia, esperanza de vida y pauta de puesta de huevos de *C. elegans***

De igual manera que en el caso del extracto de coliflor se estudió el efecto del quitosano de insecto y crustáceo sobre *C. elegans* a una concentración que se

considera antimicrobiana (0,15%) *in vitro* (Fernandes et al., 2008; Honarkar y Barikani, 2009; No et al., 2002; Vilar Junior et al., 2016). La figura VI.1.5 muestra las curvas de supervivencia donde se recoge el efecto de soluciones de quitosano al 0,15% sobre las distintas poblaciones de *C. elegans*.



EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

EC-AC: *C. elegans* alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con ácido acético

EC-AC-QC: *C. elegans* alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de crustáceo al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

EC-AC-QI: *C. elegans* alimentados con *E. coli* OP50 en placas de NGM con solución de quitosano de insecto al 0,15 % (p/v) disuelto en ácido acético

**Figura VI.1.5.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con quitosano. Cada punto representa el promedio de la fracción de nematodos vivos a ese tiempo  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

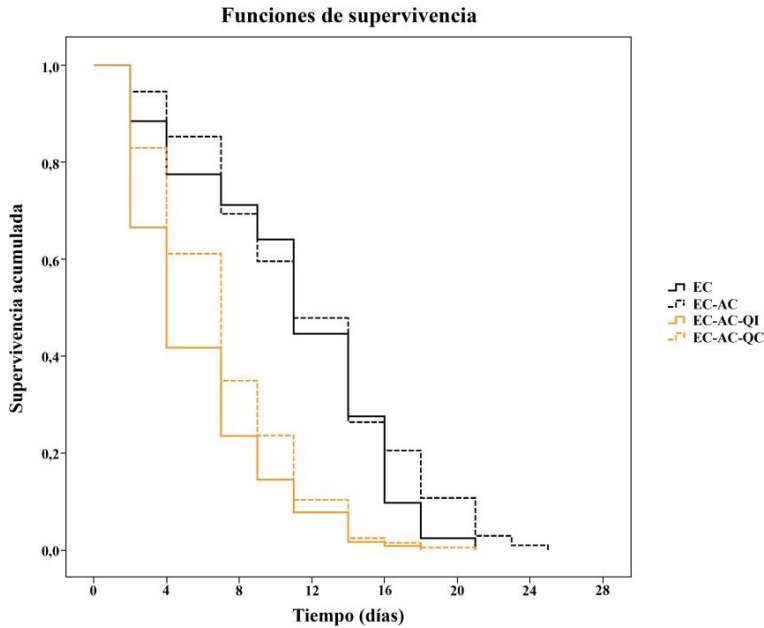
En términos generales, la figura VI.1.5 muestra que el número de nematodos que mueren por intervalo de tiempo es mayor cuando se alimentan en un medio que contiene quitosano en comparación con aquellos que se alimentan en ausencia de quitosano. Si se examinan con detalle las curvas de supervivencia

parece que el quitosano de insecto es más nocivo para *C. elegans* que el quitosano de crustáceo, al menos hasta el día 9 de vida.

No obstante, entre los grupos tratados con quitosano, el número de gusanos que sobrevive por intervalo de tiempo fue similar a partir del día 11 independientemente de la fuente de quitosano. La población alimentada con quitosano de insecto (EC-AC-QI) sobrevivió únicamente hasta el día 18, seguida del grupo alimentado con quitosano de crustáceo (EC-AC-QC) y de los controles sin acidificar (EC) y acidificado (EC-AC). Por consiguiente, parece que la adición de quitosano a concentraciones que se consideran antimicrobianas, independientemente de su origen, reduce la supervivencia de *C. elegans*, es decir, el quitosano a la concentración empleada tiene un efecto nocivo sobre *C. elegans*.

Los datos de supervivencia se analizaron mediante el método de Kaplan Meier por intervalos, obteniéndose las funciones estimadas de supervivencia, las funciones estimadas de riesgo acumulado y los percentiles estimados para la distribución de supervivencia.

En la figura VI.1.6 se representan las probabilidades de supervivencia mediante las funciones estimadas de supervivencia de *C. elegans* alimentado con quitosano de crustáceo e insecto al 0,15% (p/v) frente a las otras poblaciones.



**Figura VI.1.6.** Funciones estimadas de supervivencia para las distintas poblaciones del estudio con quitosano.

Las funciones estimadas de supervivencia obtenidas muestran una probabilidad de supervivencia superior para los nematodos que no han estado expuestos a cualquiera de los quitosanos. El test de Tarone-Ware realizado mediante comparaciones por parejas de grupos reflejó que, mientras que la supervivencia de los grupos alimentados sin quitosano no fue significativamente diferente entre ellos ( $p = 0,310$ ), sí lo fue respecto a la supervivencia de los nematodos alimentados con quitosano ( $p < 0,001$ ). Además, la supervivencia del grupo alimentado con quitosano de insecto fue significativamente inferior a la del grupo alimentado con dicha sustancia natural procedente de crustáceo ( $\chi^2 = 15,7$ , grados de libertad =3,  $p < 0,001$ ) (Tabla VI.1.3).

**Tabla VI.1.3.** Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con quitosano.

TEST	TRATAMIENTOS	ESTADÍSTICO ( $\chi^2$ )	GRADOS DE LIBERTAD	P- VALOR*
Log-Rank	EC	EC-AC	2,3	0,127
		EC-AC-QI	89,4	<0,001
		EC-AC-QC	56,9	<0,001
	EC-AC	EC-AC-QI	89,3	<0,001
		EC-AC-QC	60,8	<0,001
	EC-AC-QI	EC-AC-QC	11,7	0,001
Breslow	EC	EC-AC	0,6	0,449
		EC-AC-QI	72,9	<0,001
		EC-AC-QC	43,1	<0,001
	EC-AC	EC-AC-QI	79,4	<0,001
		EC-AC-QC	47,9	<0,001
	EC-AC-QI	EC-AC-QC	17,8	<0,001
Tarone-Ware	EC	EC-AC	1,0	0,310
		EC-AC-QI	83,5	<0,001
		EC-AC-QC	51,8	<0,001
	EC-AC	EC-AC-QI	86,6	<0,001
		EC-AC-QC	55,2	<0,001
	EC-AC-QI	EC-AC-QC	15,7	<0,001

\*Las funciones de supervivencia de cada test fueron significativamente distintas si  $p \leq 0,05$

La siguiente tabla (Tabla VI.1.4) recoge los percentiles estimados para la distribución de supervivencia del nematodo.

**Tabla VI.1.4.** ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles 75, 50 y 25 para la distribución de supervivencia de *C. elegans* en distintos medios de alimentación del estudio con quitosano.

PERCENTIL (%)	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DÍAS ± ERROR ESTÁNDAR)			
	EC	EC-AC	EC-AC-QI	EC-AC-QC
75	5,9 ± 1,4 <sup>ab</sup>	6,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,7 <sup>ab</sup>
50	11,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	10,7 ± 1,9 <sup>a</sup>	3,5 ± 1,3 <sup>b</sup>	5,0 ± 2,2 <sup>b</sup>
25	14,2 ± 2,0 <sup>a</sup>	14,4 ± 2,8 <sup>a</sup>	6,9 ± 2,9 <sup>b</sup>	7,8 ± 1,3 <sup>b</sup>

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p \leq 0,05$ )

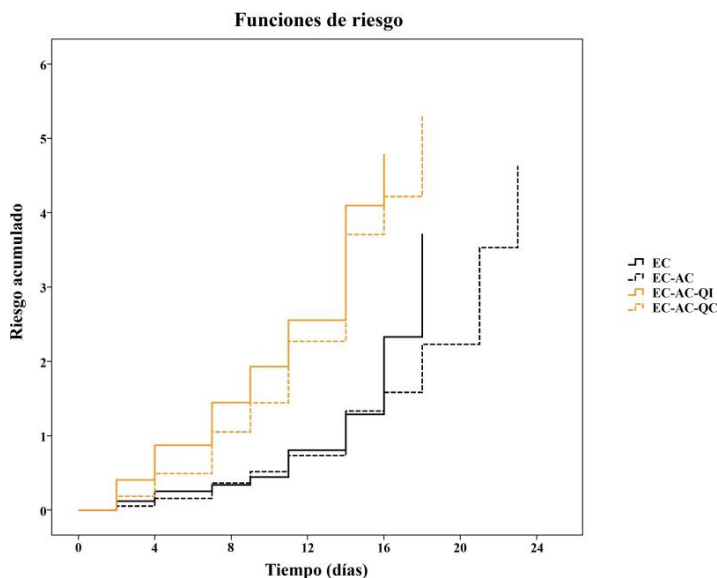
Tal como se observó en la figura VI.1.5, los nematodos alimentados en ausencia de quitosano en el medio NGM sobrevivieron más días que aquellos tratados con soluciones de quitosano al 0,15 % (p/v) para cada uno de los percentiles estudiados (Tabla VI.1.4). El 75% de los nematodos sobrevivieron más días en los medios control (5,9 días) y control ácido (6,3 días) que en los grupos expuestos a quitosano de insecto (1,8 días) ó crustáceo (2,7 días) aunque no de manera significativa. Además, los nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en medio NGM con ácido acético (EC-AC) sobrevivieron 14,4 días en el percentil 25, siendo la población más longeva de entre las estudiadas, mientras que el 25% de los nematodos alimentados con soluciones de quitosano de insecto y de crustáceo sobrevivieron 6,9 y 7,8 días respectivamente.

Si nos fijamos en el percentil 50 de la tabla VI.1.4, se observa que el 50% de la población de nematodos alimentados con quitosano de crustáceo sobrevivió aproximadamente 5 días. Esta tendencia se observó también en el estudio de



Ma, Garrido-Maestu, Lee, et al. (2017), quienes estudiaron el posible efecto tóxico en *C. elegans* producido por micropartículas con 0,1 y 0,4% de quitosano de diferente peso molecular (bajo peso molecular (LMWC) y alto peso molecular (HMWC)) elaboradas con sulfato de sodio (SS) y tripolifosfato de sodio (TPP). La esperanza de vida disminuyó cuando los nematodos se trataron con LMWC-SS y HMWC-TPP en comparación con el control, resultando en una mayor mortalidad para el grupo tratado con LMWC-SS.

Por otro lado, la figura VI.1.7 muestra las funciones estimadas de riesgo acumulado de *C. elegans* alimentados en cada uno de los tratamientos del estudio con quitosano al 0,15% (p/v).

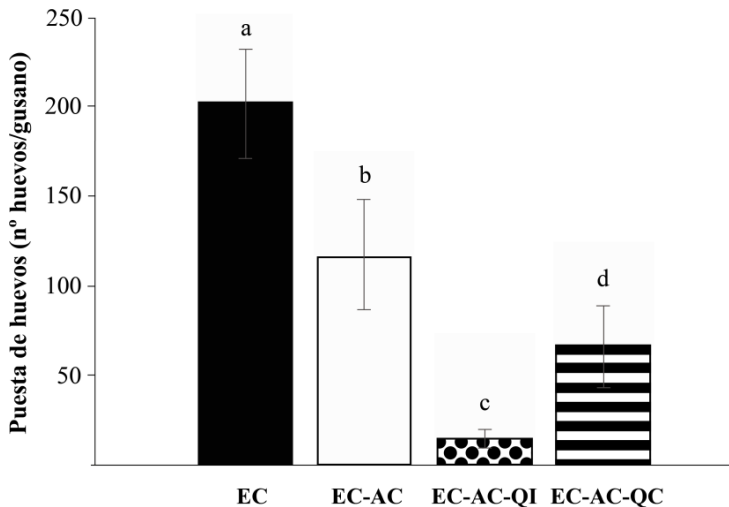


**Figura VI.1.7.** Funciones estimadas de riesgo acumulado de las poblaciones del estudio con quitosano.

Como se puede observar, la población expuesta a un medio con quitosano tuvo

un mayor riesgo de muerte respecto a las poblaciones alimentadas con un medio sin quitosano. Se demostró que la velocidad de muerte a partir del día 16 para los nematodos del grupo control sin acidificar (EC) fue mayor que la velocidad de muerte para los nematodos del grupo control acidificado (EC-AC). El máximo incremento del riesgo de mortalidad tuvo lugar el día 21 para el grupo EC-AC, lo cual coincide con el periodo en el que los gusanos están más próximos al final de su vida, senescencia. En relación a las poblaciones expuestas a quitosano, el máximo riesgo de mortalidad se alcanzó el día 14 para los grupos tratados con quitosano de insecto y crustáceo.

Adicionalmente al estudio de supervivencia de *C. elegans*, en la presente tesis se estudió el efecto de los dos quitosanos sobre la pauta de puesta de huevos por nematodo (Figura VI.1.8).



**Figura VI.1.8.** Promedio de la puesta de huevos de *C. elegans* en diferentes sustratos del estudio con quitosano (promedio (n° huevos/gusano)  $\pm$  desviación estándar (barras de error)).

La figura VI.1.8 muestra el promedio de huevos puestos por nematodo en cada grupo de población en estudio. Se han observado diferencias significativas

entre todas las poblaciones analizadas ( $p \leq 0,05$ ). El número de huevos puestos por los nematodos alimentados con *E. coli* OP50 (EC) fue significativamente superior a los puestos por las otras poblaciones conteniendo ácido acético ( $p \leq 0,05$ ) solo, o quitosano de insecto o quitosano de crustáceo. El resultado parece indicar que el ácido acético podría afectar negativamente la puesta de huevos de *C. elegans*.

Es importante destacar el impacto negativo que tiene el quitosano sobre la puesta de huevos de los nematodos. El número de huevos puestos por los nematodos se redujo en gran medida al exponerse estos a los medios con quitosano. En concreto, el número de huevos por gusano en el grupo expuesto a *E. coli* OP50 con adición de 0,15% (v/v) de quitosano de crustáceo fue aproximadamente de 66 mientras que los huevos puestos por gusano en un medio conteniendo ácido acético fue de 116. En el caso del quitosano de insecto también hubo una reducción en la puesta de huevos por gusano, siendo de 15 huevos por gusano frente a los 66 que pusieron en un medio conteniendo quitosano de crustáceo. Este efecto sobre la puesta de huevos podría estar relacionado con una acción del quitosano en algún nivel del sistema de producción, maduración o deposición de los huevos. Podría ser un efecto a nivel bioquímico o meramente fisiológico, por ejemplo inflamación de la vulva, lo que hace que los huevos se retengan en el conducto tal como ocurre con los gusanos infectados con *Listeria monocytogenes* (Silva et al., 2015). El efecto del quitosano en la puesta de huevos no es un hecho extraño en la naturaleza. Se ha descrito en la bibliografía científica que algunas sustancias naturales inocuas para el ser humano, por ejemplo la miel, han mostrado un efecto nocivo sobre *C. elegans* caracterizado por una eclosión interna de los huevos cuando los nematodos se expusieron a concentraciones de 3-6% de miel durante 48 horas (Sajid y Azim, 2012). En el estudio de Sajid y Azim (2012) se observó que la incubación de *C. elegans* durante 24 horas con 0,03% y 0,1%

de miel natural produjeron interferencias en la puesta de huevos, produciéndose una reducción en la puesta de huevos del 60%, llevando a inhibirse con una exposición del 6% de miel. En nuestro estudio, el porcentaje de reducción en la puesta de huevos de la población alimentada tratada con quitosano de crustáceo respecto al grupo control EC fue del 67,3%, similar al del estudio de Sajid y Azim (2012) en miel. Además estos autores indicaron que la puesta de huevos de nematodos expuestos a 0,1 y 0,3% de miel artificial (D-fructosa, D-glucosa, maltosa y sacarosa en agua desionizada) se incrementó (110 huevos por gusano) respecto al control (100 huevos por gusano) para posteriormente caer hasta un nivel del 90-75% cuando se expusieron a concentraciones del 1% al 6% de miel (Sajid y Azim, 2012). En la presente tesis, el estudio de la puesta de huevos de *C. elegans* expuesto a quitosano de insecto al 0,15% dió como resultado valores similares a los mencionados por Sajid y Azim (2012), con reducción de la puesta de huevos en un 92,5%.

En resumen, se podría decir que las soluciones de quitosano tienen un efecto negativo sobre la supervivencia de *C. elegans*, además de afectar en la puesta de huevos, siendo dichos efectos más pronunciados en la población alimentada con quitosano de insecto. El quitosano a estas concentraciones con fuerte capacidad antimicrobiana para algunos microorganismos podría estar ejerciendo un efecto nocivo sobre el nematodo. Existen estudios que destacan que a determinadas concentraciones, el quitosano se puede considerar nematocida (MAM et al., 2019). Más específicamente, se conoce que los antihelmínticos afectan a *C. elegans* vía digestiva ó a través de la cutícula (Holden-Dye y Walker, 2014).

Según estudios *in vitro*, la concentración de quitosano considerada antimicrobiana depende del microorganismo y otros factores, oscilando la concentración mínima inhibitoria entre 0,08 y > 0,1% para microorganismos

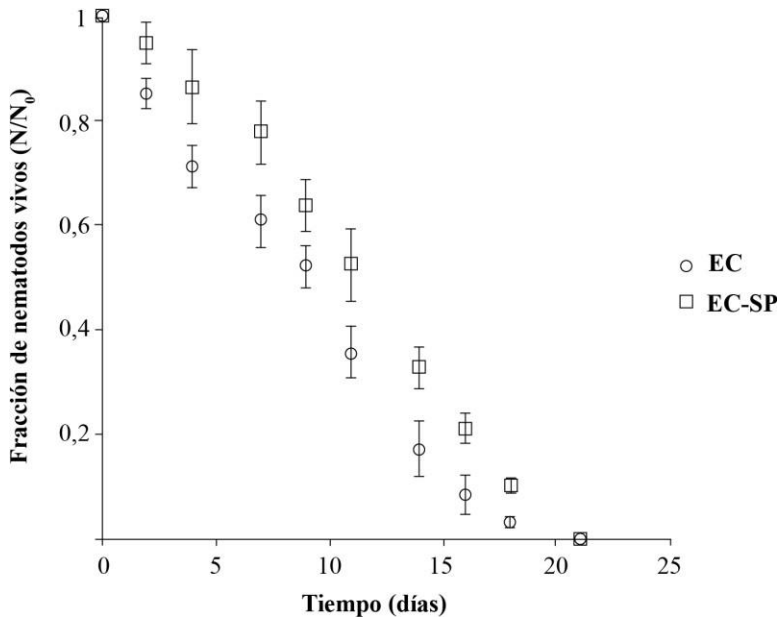
como *E. coli*, *S. Typhimurium* y *L. monocytogenes* dependiendo del peso molecular (Liu et al., 2006; No et al., 2002), y del 1-2% en envases para alimentos en forma de disolución en ácido acético o en forma de películas (Hu, 2018).

En el presente estudio, se eligió una concentración de quitosano lo más baja posible para que ejerciera su efecto antimicrobiano en microorganismos que infectan *C. elegans* y evitar la posibilidad de que fuera nocivo para el nematodo. Finalmente, conviene hacer la siguiente reflexión. La quitina y el quitosano de crustáceo se consideran inocuos para el ser humano por lo que se podrían considerar sustancias GRAS (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2019; Ochoa Yepes et al., 2018), sin embargo, Stoffolano et al. (2020) encontraron que la longevidad de individuos adultos de *Musca domestica* L., *Tabanus nigrovittatus* Macquart y *Phormia regina* se redujo tras ser alimentados con una solución al 2% de quitosano de bajo peso molecular disuelto en ácido ascórbico al 2% y sacarosa al 10% frente al grupo control (ácido ascórbico al 2% con sacarosa al 10%). Este comportamiento podría estar relacionado con la concentración y el peso corporal de los individuos, de tal manera que, la cantidad ingerida de solución de quitosano para el peso de cada organismo podría estar influyendo en el efecto nocivo. Por ejemplo, se conoce que *Musca domestica* L. llega a pesar entre 17-24 mg (Busvine, 1965) y *Phormia regina* alrededor de 60 mg (Brust y Fraenkel, 1955), mientras que el peso húmedo de *C. elegans* es de 1 µg (Muschiol et al., 2009). Esto indica que *C. elegans* es aproximadamente 1000 veces menos pesado que los insectos mencionados, y esto unido a que la concentración de quitosano administrada es aproximadamente sólo 10 veces menor (0,15%) respecto a la empleada para los insectos (2%), podría ser un condicionante más que justificara la menor supervivencia del nematodo. En resumen, se podría decir que la inocuidad del quitosano a las concentraciones necesarias para que ejerza su actividad

antimicrobiana podría depender del peso corporal de cada ser vivo. Los resultados del presente estudio, en los que se ha observado un efecto negativo de dicha concentración de ambos quitosanos sobre la esperanza de vida de *C. elegans*, hace que no se puedan realizar los estudios para determinar su efecto antimicrobiano *in vivo* por lo que se recurrirá a realizar estudios *in vitro* para distintos microorganismos patógenos, niveles de pH y de inóculo.

### **VI.1.2.3 Efecto de soluciones de espirulina al 0,1 % (p/v) en la esperanza de vida, supervivencia y puesta de huevos de *C. elegans***

Siguiendo con los estudios tendentes a dilucidar la naturaleza del efecto de algunos compuestos naturales sobre *C. elegans*, se estudió el efecto de un extracto de espirulina en la supervivencia, esperanza de vida y puesta de huevos del nematodo. La figura VI.1.9 muestra la fracción de supervivientes de *C. elegans* alimentados en los diferentes medios considerados en este estudio.



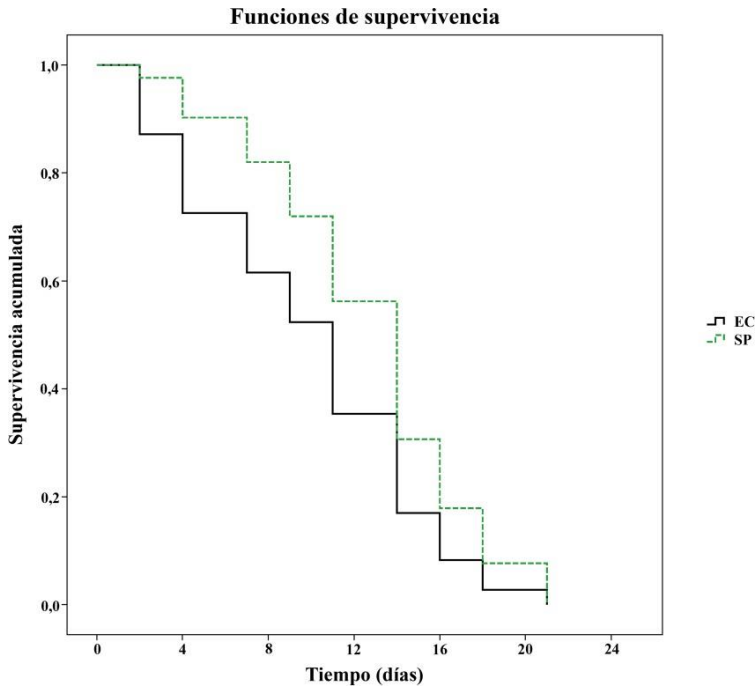
EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

EC-SP: *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) y alimentados con *E. coli* OP50

**Figura VI.1.9.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* alimentados en los distintos medios empleados en el estudio con extracto de espirulina. Cada punto representa el promedio de la fracción de nematodos vivos a ese tiempo  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

Como se puede ver en la figura VI.1.9, la esperanza de vida del nematodo es similar en los medios de alimentación. Sin embargo, la fracción de nematodos que mueren por intervalo de tiempo entre los días 2 y 18 es mayor para aquellos alimentados con *E. coli* OP50 que la observada para aquellos alimentados con un medio de *E. coli* OP50 con espirulina. Este resultado está en la línea del obtenido cuando se alimentaron con un extracto de coliflor. Así, la espirulina parece ejercer un efecto positivo en la vida del nematodo. En algunos trabajos se ha descrito la capacidad antioxidante de *Spirulina* y su efecto beneficioso para los organismos vivos (Brito et al., 2020), así que esta podría ser una

explicación para tal comportamiento. Los datos de supervivencia se analizaron mediante el método de Kaplan Meier por intervalos, con objeto de obtener los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de los nematodos. La figura VI.1.10 muestra las funciones estimadas de supervivencia para los nematodos alimentados en presencia y ausencia del extracto de espirulina.



**Figura VI.1.10.** Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio con extracto de espirulina.

La figura VI.1.10 refleja una mayor probabilidad de supervivencia de los nematodos alimentados en medio NGM suplementado con extracto de espirulina (EC-SP) respecto al grupo control (EC), desde el día 2 hasta el final del seguimiento. A pesar de esto, la esperanza de vida para los nematodos de ambos grupos de estudio fue de 21 días, siendo el día 14 el momento en el que tuvo lugar una reducción mayoritaria de las poblaciones estudiadas



independientemente del tratamiento. Esta diferencia entre las funciones de supervivencia de ambos tratamientos demostró ser significativa mediante el test de Tarone-Ware ( $\chi^2 = 30,4$ , grados de libertad = 1,  $p < 0,001$ ) (Tabla VI.1.5).

**Tabla VI.1.5.** Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio con espirulina.

TEST	ESTADÍSTICO ( $\chi^2$ )	GRADOS DE LIBERTAD	P-VALOR*
Log-Rank	26,8	1	< 0,001
Breslow	32,4	1	< 0,001
Tarone-Ware	30,4	1	< 0,001

\*Las funciones de supervivencia de cada test fueron significativamente distintas si  $p \leq 0,05$

Los percentiles estimados para la distribución de supervivencia de *C. elegans* deducidos del análisis de Kaplan Meier se resumen en la tabla VI.1.6.

**Tabla VI.1.6.** Prueba t-student para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de *C. elegans* en los diferentes medios de alimentación del estudio con espirulina.

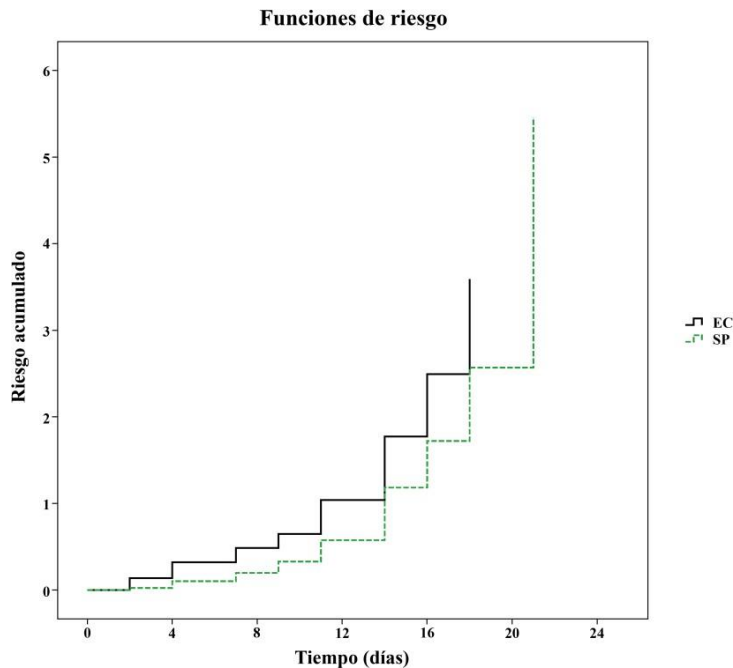
PERCENTIL (%)	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DÍAS ± ERROR ESTÁNDAR)	
	EC	EC-SP
75	5,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	7,9 ± 2,3 <sup>a</sup>
50	8,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	12,3 ± 1,9 <sup>b</sup>
25	12,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	15,5 ± 2,2 <sup>b</sup>

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p \leq 0,05$ ).

Como se puede apreciar en la tabla VI.1.6, el porcentaje de nematodos que sobreviven un determinado intervalo de tiempo fue mayor cuando se alimentaron en el medio con extracto de espirulina con respecto a los que se alimentaron en el medio conteniendo exclusivamente el césped de *E. coli* OP50 en ausencia de espirulina. El 50% de los nematodos del grupo EC-SP sobrevivieron un periodo de tiempo igual a 12,3 días, mientras que de los alimentados con *E. coli* OP50 (EC), el 50% de los gusanos sobrevivió 8,9 días ( $p \leq 0,05$ ).

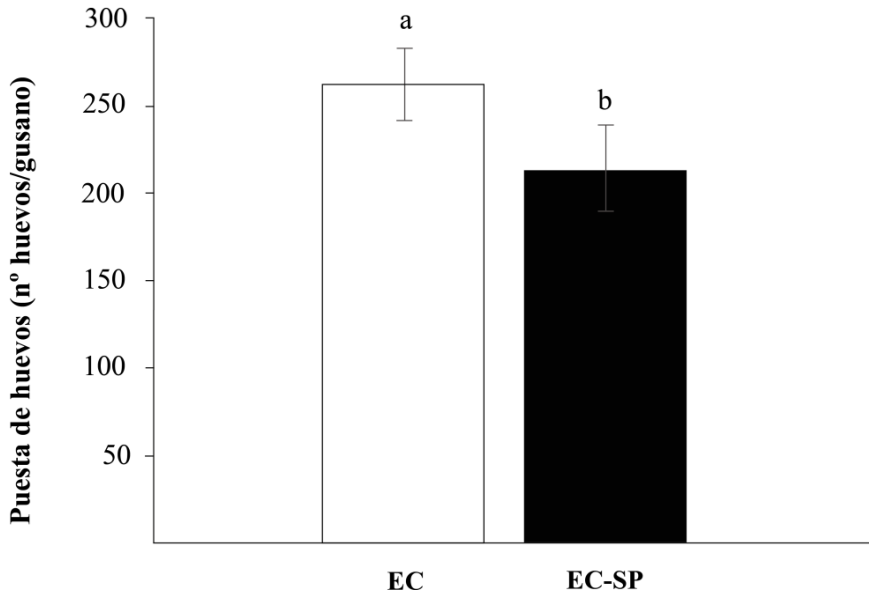
Por otra parte, la figura VI.1.11 muestra las funciones estimadas de riesgo acumulado. En ella se puede apreciar que la mortalidad se incrementa paulatinamente para ambos grupos de nematodos EC y EC-SP, y, a partir del día 11 se evidencia un incremento del riesgo de mortalidad, más pronunciado que los tiempos anteriores, posiblemente debido a la propia senescencia de *C. elegans*. En todo momento, los nematodos alimentados con el extracto de espirulina (EC-SP) presentaron un menor riesgo de muerte comparados con su

grupo (EC), lo cual es coherente con las probabilidades de supervivencia reflejadas en las funciones estimadas de supervivencia (Figura VI.1.10). Estos resultados parecen indicar que el extracto de espirulina puede influir positivamente en la supervivencia de los nematodos reduciendo el número de nematodos que mueren por intervalo de tiempo.



**Figura VI.1.11.** Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio con extracto de espirulina.

Otro parámetro que siempre es de interés y en muchas ocasiones complementa los resultados de supervivencia como indicador del efecto de determinados compuestos naturales sobre *C. elegans*, es la pauta de puesta de huevos, expresado como número de huevos promedio que cada nematodo pone a lo largo de su vida. Este análisis se puede apreciar en la figura VI.1.12.



**Figura VI.1.12.** Número promedio de huevos por gusano a lo largo de su vida en el estudio con espirulina (promedio (n° huevos/gusano)  $\pm$  desviación estándar (barras de error)).

Como se puede observar en la figura VI.1.12, los gusanos alimentados en *E. coli* OP50 pusieron más huevos por individuo que aquellos alimentados con *E. coli* OP50 suplementado con espirulina. Además, esta diferencia en el número de huevos puestos por gusano en el medio de *E. coli* OP50 fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), lo cual podría indicar un cierto efecto de la espirulina en el sistema reproductor del gusano. Estos resultados contrastan con las tendencias encontradas por Palacios-Gorba et al. (2020), quienes alimentaron *C. elegans* con fucoidina procedente de algas de la clase *Phaeophyceae*. Esta sustancia, presente en la pared celular de algas pardas, fue capaz de aumentar ligeramente el número de huevos puestos por los nematodos respecto a su grupo control alimentado exclusivamente con *E. coli* OP50. En estos estudios con fucoidina, el éxito reproductivo, es decir, el número total de huevos puestos por día por los nematodos en cada grupo (125 gusanos/grupo)

fue de 172 huevos para los nematodos alimentados con *E. coli* OP50 en presencia de 100 µg/mL de fucoidina y de 155 huevos para los nematodos del grupo control alimentados sólo con *E. coli* OP50. Cabe resaltar la existencia de diferencias entre el presente estudio y el realizado por Palacios-Gorba et al. (2020), en cuanto a las condiciones de crecimiento (25 °C) y una mayor manipulación (transferencia 3 veces/día a placas con nuevo medio de alimentación), lo cual podría quizá propiciar la estimulación reproductiva tal como indicaron Cram (2015) y Voglis y Tavernarakis (2005).

El efecto positivo de las algas sobre la supervivencia de *C. elegans* observado en la presente tesis ya se ha visto para otras algas distintas a la *Spirulina*. Se ha observado que ciertos componentes de las algas rojas como la agarosa pueden dar lugar a neoagar-oligosacáridos mediante hidrólisis enzimática que producen un aumento en la esperanza de vida de *C.elegans* (C. Wu et al., 2021). En concreto, el tratamiento de los nematodos con concentraciones entre 0,4 y 3,2 mM de neoagaroteatrosa produjo una mejoría en la supervivencia y en la esperanza de vida, sobreviviendo hasta el día 30 del estudio. Otros estudios con pigmentos extraídos de cianobacterias apoyan esta misma tendencia, con una supervivencia de 15 días para la población control llegando a 19,9 días en el caso de la población expuesta a 100 µg/mL de ficoeritrina (Sonani, Singh, Awasthi, et al., 2014).

En conclusión, el extracto de espirulina parece tener un impacto positivo sobre la supervivencia de *C. elegans* a pesar de no observarse diferencias en cuanto a la esperanza de vida respecto a la población alimentada sin el extracto. Sin embargo, la presencia del extracto de espirulina reduce el número de huevos puestos por nematodo en comparación con el grupo control.

### VI.1.3 Conclusiones

Las distintas sustancias naturales estudiadas afectaron en diferente medida a la supervivencia de *C. elegans*.

La exposición a extractos de subproductos de coliflor al 3% y de espirulina al 0,1% incrementaron de manera significativa la supervivencia de los nematodos aunque la esperanza de vida no se vió afectada. Sin embargo, estos extractos parecieron tener cierto efecto negativo en la puesta de huevos pues redujeron significativamente el número de huevos puestos por nematodo respecto a la puesta producida por su grupo control. Quizá sería interesante profundizar en este comportamiento en un futuro.

Por el contrario, la supervivencia de los nematodos se vió comprometida en presencia de quitosano de crustáceo ó insecto al 0,15%, lo cual podría significar un efecto negativo que va asociado a una disminución significativa de la puesta de huevos de *C. elegans*.







---

*Capítulo 2: Efecto antimicrobiano de quitosano frente a E. coli O157:H7, L. monocytogenes y S. Typhimurium in vitro*

---

### **VI.2.1 Introducción**

El quitosano es un producto natural obtenido de la desacetilación de la quitina, homopolisacárido estructural que ejerce una función protectora en artrópodos como crustáceos e insectos estando presente tanto en estructuras externas como internas.

Las propiedades físicas y químicas del quitosano varían, entre otros factores, según la fuente elegida y parte del cuerpo del animal, y en función de las condiciones de procesado. A su vez, la capacidad antimicrobiana del quitosano dependerá de factores intrínsecos, como su peso molecular, físicos, como estado sólido o en disolución, y ambientales, como pH y temperatura, así como del tipo de microorganismo sobre el que tiene que actuar (Ma, Garrido-Maestu, y Jeong, 2017).

En la actualidad, los crustáceos son considerados fuente mayoritaria de quitina. No obstante, su disponibilidad está sujeta al suministro estacional de recursos marinos y su purificación conlleva altos costes (largo tiempo, alta temperatura y concentraciones de químicos elevadas). De esta forma, los insectos, de fácil obtención, mantenimiento y menor contenido en materia inorgánica, surgen

como una potencial fuente de quitina aún por explorar (van den Broek y Boeriu,2020).

Sin embargo, no existe información comparativa entre el quitosano de crustáceo y de insecto en cuanto a su capacidad bioactiva, en concreto, antimicrobiana. Partiendo de los resultados anteriores en los que se ha puesto de manifiesto el efecto nocivo del quitosano, a la concentración estudiada, sobre *C. elegans* y que hace inviable los estudios *in vivo*, en este capítulo se compara el efecto antimicrobiano *in vitro* de quitosano procedente de insecto con quitosano de crustáceo a pH 5,0 y 6,2 frente a patógenos alimentarios (*Salmonella*, *E. coli* y *Listeria*) inoculados en un medio de crecimiento a concentraciones de  $10^3$  y  $10^6$  UFC/mL.

## VI.2.2 Resultados y discusión

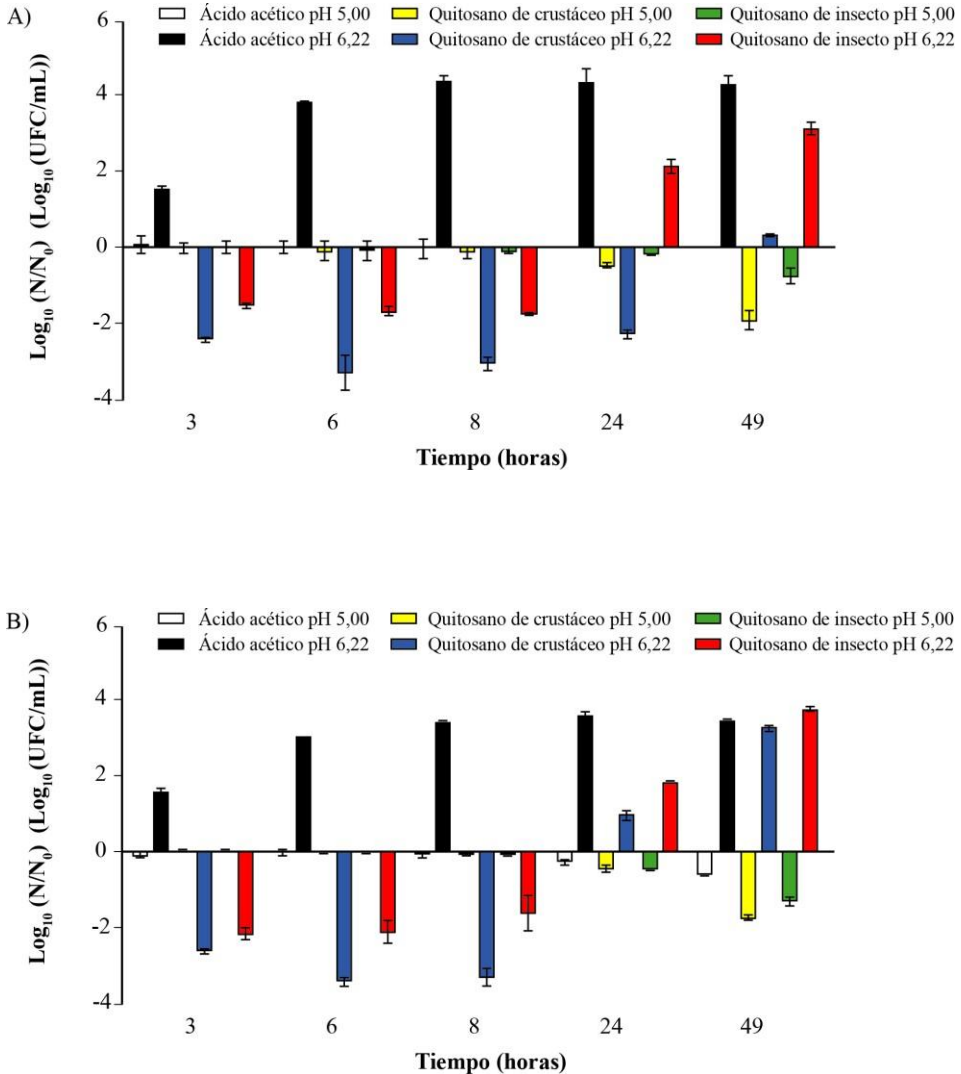
En este capítulo se determinó la capacidad antimicrobiana *in vitro* de quitosano frente a *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* mediante estudios de inoculación a distintos tiempos de incubación (0-49 h) y a 37 °C. En el estudio se incluyeron controles sin acidificar, a pH neutro, así como controles ácidos con la finalidad de conocer el efecto sobre el microorganismo debido únicamente al ácido acético, utilizado para acidificar y favorecer la disolución del quitosano.

### VI.2.3 Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a *E. coli*

Las figuras VI.2.1 A y B muestran los resultados del efecto del quitosano sobre *E. coli* entre 0 y 49 horas de incubación a 37 °C. Los resultados muestran el logaritmo de la fracción de supervivientes a tiempo *t*, calculada como el cociente entre la concentración de microorganismos a tiempo *t* respecto a la inicialmente inoculada. De modo que, valores positivos del logaritmo de la fracción de supervivientes indican crecimiento del microorganismo durante la incubación, mientras que valores negativos de dicha fracción indican muerte del microorganismo.

Como se puede apreciar, para un nivel de inóculo de  $10^3$  UFC/mL, la solución de ácido acético a pH 5,0 no ocasionó una variación significativa en el recuento microbiano durante las 49 horas de incubación (Figura VI.2.1 A). Se observó un resultado similar para el mismo medio inoculado con  $10^6$  UFC/mL (Figura B). A pH 6,2, las células de *E. coli* crecieron hasta alcanzar la fase estacionaria a las 8 horas de incubación, posiblemente debido a que este pH es más favorable para el crecimiento del microorganismo (Figura VI.2.1 A). Para un

tamaño de inóculo de  $10^6$  UFC/mL se observó el mismo comportamiento (Figura VI.2.1 B).



**Figuras VI.2.1.** Evolución de *E. coli* en diferentes sustratos con una contaminación inicial de  $10^3$  UFC/mL (A) y  $10^6$  UFC/mL (B). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

Cuando *E. coli* se incubó a pH 5,0 en presencia de quitosano de crustáceo e insecto, no se observó una variación considerable en el recuento del microorganismo (efecto bacteriostático), aunque parece que hay un efecto bactericida a partir de las 24 horas ligeramente mayor del quitosano de crustáceo que de insecto (Figuras VI.2.1 A y VI.2.1 B).

A pH 6,2, el efecto de la adición de quitosano al medio produjo una disminución en el número de células del patógeno que fue mayor en el tratamiento con quitosano de crustáceo que con el de insecto. Sin embargo, después de 8 horas de incubación, se observó un incremento en el recuento microbiano hasta las 49 horas de incubación, alcanzando una concentración de microorganismo mayor que la concentración inicial a tiempo 0.

En general, considerando ambos valores de pH, el comportamiento de *E. coli* fue independiente del tamaño de inóculo inicial, por lo que podría considerarse que el tamaño de inóculo no afectó el comportamiento microbiano a lo largo del periodo de incubación.

#### **VI.2.3.1. Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano frente a *L. monocytogenes***

Las figuras VI.2.2 A y B muestran los resultados sobre el efecto del quitosano en *Listeria monocytogenes* para los dos niveles de inoculación.

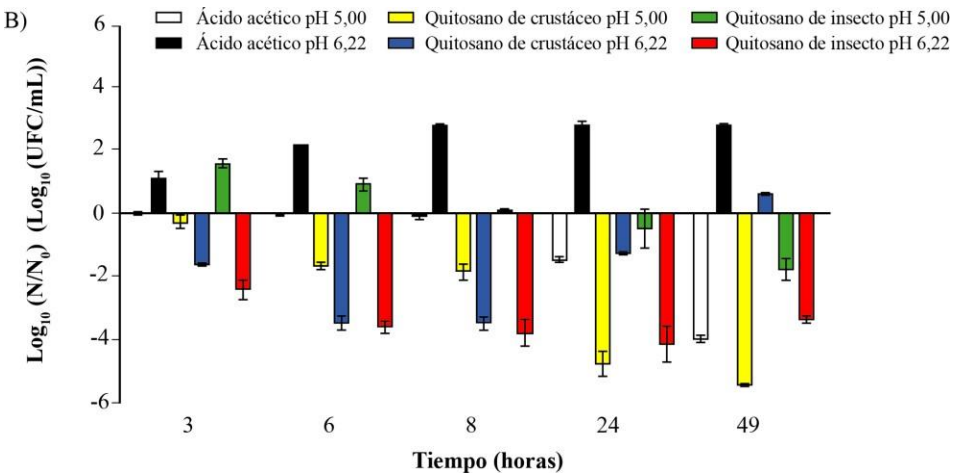
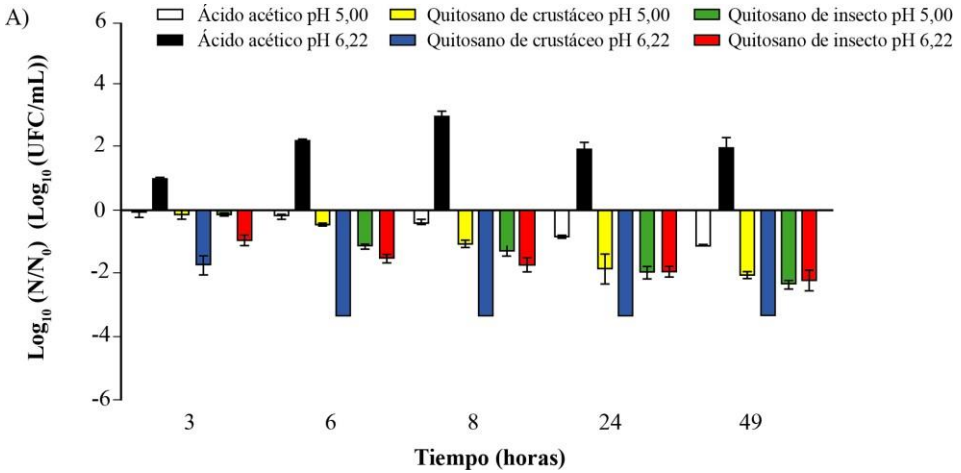
Como se puede apreciar, la solución de ácido acético a pH 5,0 produjo una disminución en el recuento microbiano durante el periodo de incubación, alcanzando reducciones logarítmicas mayores cuando la concentración de inóculo fue de  $10^6$  UFC/mL (Figuras VI.2.2 A y VI.2.2 B). Este resultado parece indicar un claro efecto bactericida del ácido acético a pH 5 frente a

este microorganismo. Sin embargo, cuando las células de *Listeria monocytogenes* se expusieron a ácido acético a pH 6,2, crecieron alcanzando la fase estacionaria después de 8 horas de incubación. Los resultados indicaron que no hubo efecto bactericida del ácido acético a pH 6,2.

Cuando las células de *Listeria monocytogenes* se expusieron a quitosano de crustáceo en ácido acético a pH 5,0, se observó una reducción en el recuento de células bacterianas a lo largo del periodo de incubación con respecto al inóculo inicial, independientemente del tamaño de inóculo. Aunque, el efecto bactericida fue mayor en el medio inoculado con  $10^6$  UFC/mL (Figura VI.2.2 B)..

En cuanto al efecto del quitosano de crustáceo en ácido acético a pH 6,2 para el tamaño de inóculo de  $10^3$  UFC/mL, se observó una rápida reducción en el número de células viables que se mantuvo al mismo nivel durante todo el periodo de incubación. Esta disminución en el recuento microbiano fue mayor que a pH 5,0. Para el tamaño de inóculo de  $10^6$  UFC/mL y pH 6,2, el resultado fue similar aunque hubo una ligera reducción del efecto antimicrobiano que produjo un leve crecimiento en el número de células a la hora 49 de incubación.

En relación a la solución de quitosano de insecto en ácido acético, la tendencia fue similar a la observada para el quitosano de crustáceo considerando ambos tamaños de inóculo y valores de pH. Hubo una disminución en el número de células en relación a la concentración de inóculo inicial. Sin embargo, de acuerdo a los resultados que se pueden observar en las figuras VI.2.2 A y VI.2.2. B, la actividad antimicrobiana del quitosano de crustáceo parece ser mayor que la correspondiente en el caso del quitosano de insecto.



**Figuras VI.2.2.** Evolución de *L. monocytogenes* en diferentes sustratos con una contaminación inicial de  $10^3$  UFC/mL (A) y  $10^6$  UFC/mL (B). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

### VI.2.3.2. Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosanofrente a *S. Typhimurium*

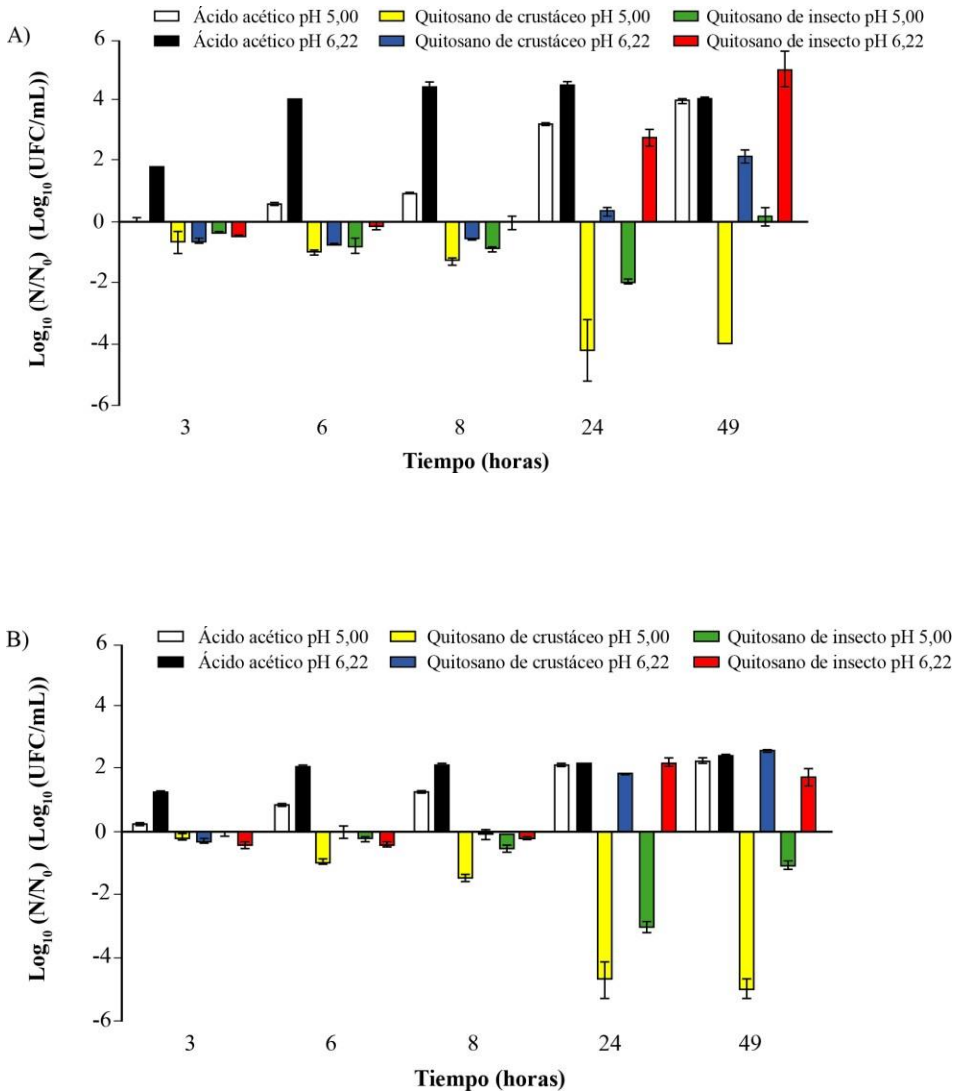
Los resultados de la evolución de *Salmonella Typhimurium* en los diferentes sustratos con un tamaño de inóculo inicial de  $10^3$  y  $10^6$  UFC/mL se muestran en las figuras VI.2.3 A y VI.2.3 B respectivamente.

Como se puede ver en las figuras VI.2.3 A y B, para ambos tamaños de inóculo se produce crecimiento celular en el sustrato de ácido acético a valores de pH de 5,0 y 6,2. Esto significa que el ácido acético a estos valores de pH no parece tener un efecto bacteriostático o bactericida frente a *Salmonella Typhimurium*.

El quitosano de crustáceo en ácido acético a pH 5,0 redujo la carga microbiana a lo largo de las 49 horas de incubación para ambos niveles de inóculo inicial. A pH 6,2, se observó una ligera disminución del recuento de *Salmonella* seguida de un período de latencia que duró aproximadamente 8 horas, momento a partir del cual se produjo un aumento del número de células a las 24 y 49 horas independientemente del tamaño del inóculo.

El quitosano de insecto en ácido acético a pH 5,0 y con un nivel de inoculación de  $10^3$  UFC/mL redujo el número de células viables a las 24 horas de incubación seguido de un ligero crecimiento a las 49 horas de incubación. En el caso del tamaño de inóculo de  $10^6$  UFC/mL, se observó una reducción de 3 ciclos logarítmicos a las 24 horas de incubación (Figura VI.2.3 B). A pH 6,2 se observó una fase de latencia que se prolongó hasta la hora 8 de incubación, seguida de un aumento en el número de células superando el nivel de inoculación inicial. Este comportamiento fue similar para ambas concentraciones de inóculo inicial.





**Figuras VI.2.3.** Evolución de *S. Typhimurium* en diferentes sustratos con una contaminación inicial de 10<sup>3</sup> UFC/mL (A) y 10<sup>6</sup> UFC/mL (B). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

### **VI.2.3.3. Efecto antimicrobiano de soluciones de quitosano en *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* tras 8 horas de incubación**

Las tablas VI.2.1, VI.2.2 y VI.2.3 muestran las concentraciones de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* respectivamente después de 8 horas de incubación en los diferentes medios de cultivo y concentraciones de inóculo. La hora 8 de incubación se consideró un buen punto de referencia para la comparación pues fue el momento en el que se alcanzó la fase estacionaria en el control (blanco) a pH 7,0 y en medio de crecimiento con ácido acético a pH 6,2 utilizado como control con fines comparativos.

La tabla VI.2.1 muestra los recuentos microbianos de *E. coli* después de 8 horas de incubación en los tratamientos control sin acidificar (blanco), control ácido y tratamientos con quitosano. De acuerdo a esa tabla, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los recuentos bacterianos entre el control sin acidificar y el resto de sustratos excepto para el nivel de inoculación  $10^6$  y pH 6,2. Además, existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los recuentos en los medios ácido acético, quitosano de crustáceo y quitosano de insecto a pH 6,2, de tal forma que todos los tratamientos con quitosano redujeron la carga microbiana a pH 6,2 en comparación con los medios ácido acético o controles sin acidificar ( $p \leq 0,05$ ). Además, a pH 6,2, el quitosano de crustáceo mostró mayor acción bactericida que el quitosano de insecto.

**Tabla VI.2.1.** Comportamiento de *E. coli* después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos.

Sustrato	*Log <sub>10</sub> (N/N <sub>0</sub> ) ± Desviación estándar			
	Tamaño de inóculo 10 <sup>3</sup> (UFC/mL)		Tamaño de inóculo 10 <sup>6</sup> (UFC/mL)	
<b>Control (LB pH=7,0)</b>	5,47 ± 0,08 <sup>A</sup>		3,31 ± 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 6,2</b>	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 6,2</b>
<b>Control ácido acético</b>	-0,11 ± 0,13 <sup>B</sup>	4,39 ± 0,04 <sup>B</sup>	-0,09 ± 0,00 <sup>B</sup>	3,34 ± 0,03 <sup>A</sup>
<b>Quitosano de crustáceo</b>	-0,12 ± 0,05 <sup>B</sup>	-3,09 ± 0,06 <sup>C</sup>	-0,06 ± 0,03 <sup>B</sup>	-3,3 ± 0,08 <sup>B</sup>
<b>Quitosano de insecto</b>	-0,11 ± 0,02 <sup>B</sup>	-1,76 ± 0,01 <sup>D</sup>	-0,07 ± 0,02 <sup>B</sup>	-1,46 ± 0,05 <sup>C</sup>

\*Log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>): El log<sub>10</sub> de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) (UFC/mL) entre el valor de la concentración de microorganismo inicial (t = 0 h) (N<sub>0</sub>) (UFC/mL).

ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey (p ≤ 0,05): valores con distinta letra indican diferencias significativas por columnas. Los valores negativos indican inactivación y los valores positivos indican crecimiento.

En cuanto a *L. monocytogenes*, la tabla VI.2.2 muestra los recuentos bacterianos tras 8 horas de incubación en el control sin acidificar (blanco) y los sustratos estudiados. El control de ácido acético a pH 5,0 redujo significativamente el número de células bacterianas independientemente del tamaño del inóculo en comparación con el control sin acidificar (blanco). De manera similar al comportamiento de *E. coli*, los tratamientos con quitosano a pH 6,2 mostraron mayores reducciones de células de *Listeria* que a pH 5,0, alcanzándose la máxima reducción con el quitosano de insecto a pH 6,2 para un tamaño de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/mL (-3,78 ciclos logarítmicos).

**Tabla VI.2.2.** Comportamiento de *L. monocytogenes* después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos.

Sustrato	*Log <sub>10</sub> (N/N <sub>0</sub> ) ± Desviación estándar			
	Tamaño de inóculo 10 <sup>3</sup> (UFC/mL)		Tamaño de inóculo 10 <sup>6</sup> (UFC/mL)	
<b>Control (LB pH=7,0)</b>	4,27 ± 0,03 <sup>A</sup>		2,98 ± 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 6,2</b>	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 6,2</b>
<b>Control ácido acético</b>	-0,37 ± 0,02 <sup>B</sup>	2,96 ± 0,11 <sup>B</sup>	-0,11 ± 0,02 <sup>B</sup>	2,73 ± 0,05 <sup>B</sup>
<b>Quitosano de crustáceo</b>	-1,07 ± 0,04 <sup>C</sup>	**ND	-1,85 ± 0,02 <sup>C</sup>	-3,48 ± 0,06 <sup>C</sup>
<b>Quitosano de insecto</b>	-1,28 ± 0,06 <sup>C</sup>	-1,73 ± 0,07 <sup>C</sup>	-0,01 ± 0,05 <sup>B</sup>	-3,78 ± 0,14 <sup>D</sup>

\*Log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>): El log<sub>10</sub> de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) (UFC/mL) entre el valor de la concentración de microorganismo inicial (t = 0 h) (N<sub>0</sub>) (UFC/mL).

\*\*ND=No detectable

ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey (p ≤ 0,05): valores con distinta letra indican diferencias significativas por columnas. Los valores negativos indican inactivación y los valores positivos indican crecimiento.

En la tabla VI.2.3 se muestran los recuentos bacterianos de *Salmonella* Typhimurium tras 8 h de incubación en el control sin acidificar (blanco) y los distintos sustratos estudiados. Como puede verse, en el control ácido hubo un aumento de los recuentos microbianos en los dos valores de pH y niveles de inóculo. En cuanto a las células de *Salmonella* en los medios con quitosano, se observaron pequeñas reducciones en todos los casos, con diferencias significativas (p ≤ 0,05) entre ellas. Según se muestra en la tabla, la reducción en los recuentos de *Salmonella* parece que depende de la fuente de quitosano, del pH y del nivel de inoculación. En general, el quitosano de crustáceo fue más efectivo frente a *Salmonella* que el quitosano de insecto, excepto para un tamaño de inóculo de 10<sup>6</sup> UFC / mL y pH 6,2 (Tabla VI.2.3).

**Tabla VI.2.3.** Comportamiento de *S. Typhimurium* después de 8 horas de incubación en diferentes sustratos.

Sustrato	*Log <sub>10</sub> (N/N <sub>0</sub> ) ± Desviación estándar			
	Tamaño de inóculo 10 <sup>3</sup> (UFC/mL)		Tamaño de inóculo 10 <sup>6</sup> (UFC/mL)	
	pH 5,0	pH 6,2	pH 5,0	pH 6,2
<b>Control (LB pH=7,0)</b>	4,47 ± 0,06 <sup>A</sup>		2,68 ± 0,05 <sup>A</sup>	
<b>Control ácido acético</b>	0,95 ± 0,02 <sup>B</sup>	4,42 ± 0,07 <sup>A</sup>	1,29 ± 0,02 <sup>B</sup>	2,12 ± 0,05 <sup>B</sup>
<b>Quitosano de crustáceo</b>	-1,28 ± 0,05 <sup>D</sup>	-0,57 ± 0,01 <sup>C</sup>	-1,51 ± 0,08 <sup>D</sup>	-0,02 ± 0,11 <sup>C</sup>
<b>Quitosano de insecto</b>	-0,90 ± 0,03 <sup>C</sup>	-0,04 ± 0,07 <sup>B</sup>	-0,55 ± 0,04 <sup>C</sup>	-0,22 ± 0,02 <sup>D</sup>

\*Log<sub>10</sub> (N/N<sub>0</sub>): El log<sub>10</sub> de la concentración de microorganismo a un tiempo determinado (N) (UFC/mL) entre el valor de la concentración de microorganismo inicial (t = 0 h) (N<sub>0</sub>) (UFC/mL).

ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey (p ≤ 0,05): valores con distinta letra indican diferencias significativas por columnas. Los valores negativos indican inactivación y los valores positivos indican crecimiento.

El efecto del quitosano como antimicrobiano en agricultura e industria alimentaria ha despertado el interés de la comunidad científica y de la industria. Allan, G. G. et al. (1984) ya estudiaron el efecto del quitosano en *E. coli* y *S. aureus*. Sin embargo, recientemente, y como consecuencia del uso de procedimientos de conservación mínimos, el interés por la capacidad antimicrobiana de este compuesto obtenido de la quitina ha incrementado. Según estudios realizados por otros autores, la capacidad antimicrobiana del quitosano se ve influida por varios factores intrínsecos (tipo de quitosano, peso molecular, grado de desacetilación, disolvente usado en la extracción y concentración) y extrínsecos, como la especie de microorganismo, su estado fisiológico, pH, temperatura, fuerza iónica, iones metálicos, la presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o de materia orgánica (Muzzarelli et al., 1990; No et al., 2002; Rabea et al., 2003; Savard et al., 2002).

Como se ha comentado anteriormente, uno de los factores que pueden influir en la efectividad del quitosano como antimicrobiano es su origen. En el presente trabajo se ha comparado el efecto antimicrobiano del quitosano de crustáceo e insecto. Los resultados señalaron diferencias entre la capacidad antimicrobiana del quitosano procedente de ambas fuentes. En general, a las 49 horas de incubación, el quitosano de crustáceo a pH 5,0 mostró mayor capacidad antimicrobiana que el quitosano de insecto, principalmente frente a *Salmonella* donde el quitosano de crustáceo produjo más de 4 ciclos logarítmicos de reducción mientras que el quitosano de insecto fue bacteriostático o produjo alrededor de un ciclo logarítmico de reducción. Este mismo comportamiento se observó en *E. coli* aunque las diferencias en cuanto al efecto antimicrobiano fueron menores que en el caso de *Salmonella*. Algunos estudios previos han indicado que el quitosano procedente de diferentes crustáceos puede tener diferentes propiedades bioactivas, lo que podría explicar las diferencias existentes entre el quitosano de crustáceo y de insecto, que son especies más separadas filogenéticamente.

El pH parece ser un factor que puede determinar el efecto antimicrobiano del quitosano. A valores de pH bajos (ácidos), el quitosano parece ser más antimicrobiano que a valores altos de pH (Jumaa et al., 2002; No et al., 2002; Raafat, 2004; Tsai y Su, 1999).

G. H. Wang (1992) llevó a cabo un estudio sobre el efecto de diferentes concentraciones de quitosano a dos valores de pH 6,5 y 5,5 en diferentes microorganismos patógenos incluyendo *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* y *Listeria monocytogenes*. El autor concluyó que el quitosano a pH 6,5 tuvo un efecto débil en los microorganismos patógenos; de hecho, no hubo inhibición de *Listeria monocytogenes*. A pH 5,5 hubo inhibición de los microorganismos entre las 24 y 72 horas de almacenamiento a 30 °C. Se concluyó que el

quitosano actúa mejor a pH 5,5 que a pH 6,5. Más recientemente, Gücükoğlu et al., (2016) también estudiaron la actividad antimicrobiana del quitosano de diferentes pesos moleculares a varios valores de pH (pH 4, 4,5 y 5) en cepas de *L. monocytogenes*. Los resultados indicaron que el valor de pH 5 mostró a las 24h de incubación la mayor reducción bacteriana independientemente del peso molecular, exceptuando en dos de las cepas frente a las que el quitosano de bajo peso molecular mostró un mayor efecto antimicrobiano a pH 4,5.

En el presente trabajo se ha observado que la influencia que pueda tener el pH en el que se disuelven los dos quitosanos estudiados sobre la capacidad antimicrobiana de estos parece depender del microorganismo.

La especie de microorganismo también parece jugar un papel importante en la capacidad antimicrobiana del quitosano disuelto en un mismo nivel de pH como se ha observado en el presente trabajo de tesis. Una explicación podría estar relacionada con diferencias en la membrana de los microorganismos. Existen varias hipótesis sobre el mecanismo antimicrobiano del quitosano. Las interacciones iónicas entre las cargas positivas de los grupos amino y moléculas negativas de la superficie de las bacterias en condiciones ácidas alteran la permeabilidad de la membrana llevando a la lisis celular (Goy y Assis, 2014; Rabea et al., 2003). Otro mecanismo podría estar relacionado con la interacción entre el quitosano y los nutrientes esenciales para las bacterias (Jia et al., 2001).

La concentración inicial de microorganismo podría también afectar el efecto bactericida del quitosano (Fernandes et al., 2008). Esos autores indicaron que después de 4 horas de incubación para un tamaño de inóculo de  $10^3$  UFC/mL, el quitosano fue bactericida a todas las concentraciones ensayadas; mientras que para los niveles de inóculo inicial mayores, la disolución al 0,1% (p/v) de quitosano sólo fue bacteriostática. También concluyeron que, independientemente de la concentración inicial de microorganismo, la

concentración de 0,25% (p/v) de cualquier mezcla de quitooligosacáridos fue suficiente para reducir la población inicial de *E. coli* al menos 3 ciclos logarítmicos. Sin embargo, según los resultados de esta tesis, los datos no son concluyentes en relación con el efecto del tamaño de inóculo porque varió en función del pH y de la especie de microorganismo; en consecuencia no es posible establecer que en todos los casos haya una actividad antimicrobiana mayor en relación a un determinado tamaño de inóculo inicial.

#### **VI.2.4 Conclusiones**

Ambos quitosanos, de crustáceo y de insecto, mostraron actividad antimicrobiana, aunque en el caso de *Salmonella*, en general, el quitosano de crustáceo fue más activo que el quitosano de insecto. Sin embargo, serían necesarios más estudios de caracterización de ambos compuestos de quitosano para interpretar estas diferencias.

El pH tiene un papel importante en la actividad antimicrobiana del quitosano, pero no se pueden sacar conclusiones acerca de la influencia del tamaño de inóculo en el efecto antimicrobiano de los compuestos de quitosano estudiados.







---

### *Capítulo 3: Efecto antimicrobiano de quitosano in vitro combinado con tecnología de altas presiones hidrostáticas (HHP) frente a S. Typhimurium*

---

#### **VI.3.1. Introducción**

En el capítulo 2 se concluyó que el quitosano tiene capacidad antimicrobiana, aunque limitada, frente a *Salmonella Typhimurium* en un medio a pH 6,2 ya que mostró una tendencia ligeramente bactericida o bacteriostática a la hora 8, pero a las 49 horas de incubación se produjo el crecimiento del microorganismo alcanzando 2 ciclos logarítmicos en el caso del quitosano de crustáceo, y entre 2 y 5 ciclos logarítmicos en el caso del quitosano de insecto. En este sentido, la aplicación de tecnología de barreras (quitosano combinado con altas presiones hidrostáticas (HHP)) puede ser una buena estrategia para aumentar la eficacia del tratamiento desde el punto de vista de la inactivación microbiana frente a *Salmonella*.

La tecnología de altas presiones (HHP) ha mostrado su idoneidad como tecnología de conservación con efectos mínimos sobre las cualidades nutricionales y sensoriales de los alimentos (Huang et al., 2020). También se han publicado trabajos en los que se muestra su capacidad para combinarla con antimicrobianos naturales con un efecto sinérgico muy interesante bajo el punto de vista de la conservación de los alimentos y su seguridad microbiológica

(Günlü et al., 2014; Malinowska-Pańczyk et al., 2009). Sin embargo, no existe hasta el momento información relativa al efecto combinado de las HHP con quitosano procedente de insecto.

Uno de los efectos no deseables de los procesos de inactivación mínimos, incluidos los procesos combinados, es la producción de células dañadas subletalmente. Éstas pueden llegar a ser un riesgo emergente por su capacidad de reparar el daño y adquirir habilidades que no están presentes en las células originales o bien adaptarse a los procesos de conservación. Por lo tanto, es importante conocer y caracterizar el porcentaje de células dañadas subletalmente y su potencial de recuperación para poder garantizar la seguridad microbiológica de un alimento tratado por esta combinación de tecnologías.

En el presente capítulo de la tesis se plantea estudiar el efecto conjunto de un tratamiento suave de HHP con una solución de quitosano de insecto en comparación con el quitosano de crustáceo y el posible daño subletal generado como consecuencia del tratamiento.

## **VI.3.2. Resultados y discusión**

### **VI.3.2.1. Efecto del quitosano de crustáceo y de insecto frente a *S. Typhimurium***

Como se ha comentado en el capítulo anterior, a pH 6,2 y a una concentración de 0,15%, tanto quitosano de insecto como de crustáceo presentan un efecto bacteriostático, impidiendo el crecimiento de *S. Typhimurium* durante el período de tiempo estudiado. Sin embargo, dichas condiciones no son capaces de inactivar al patógeno estudiado (no se aprecia efecto bactericida).

### **VI.3.2.2. Efecto de alta presión hidrostática (HHP) sobre *S. Typhimurium***

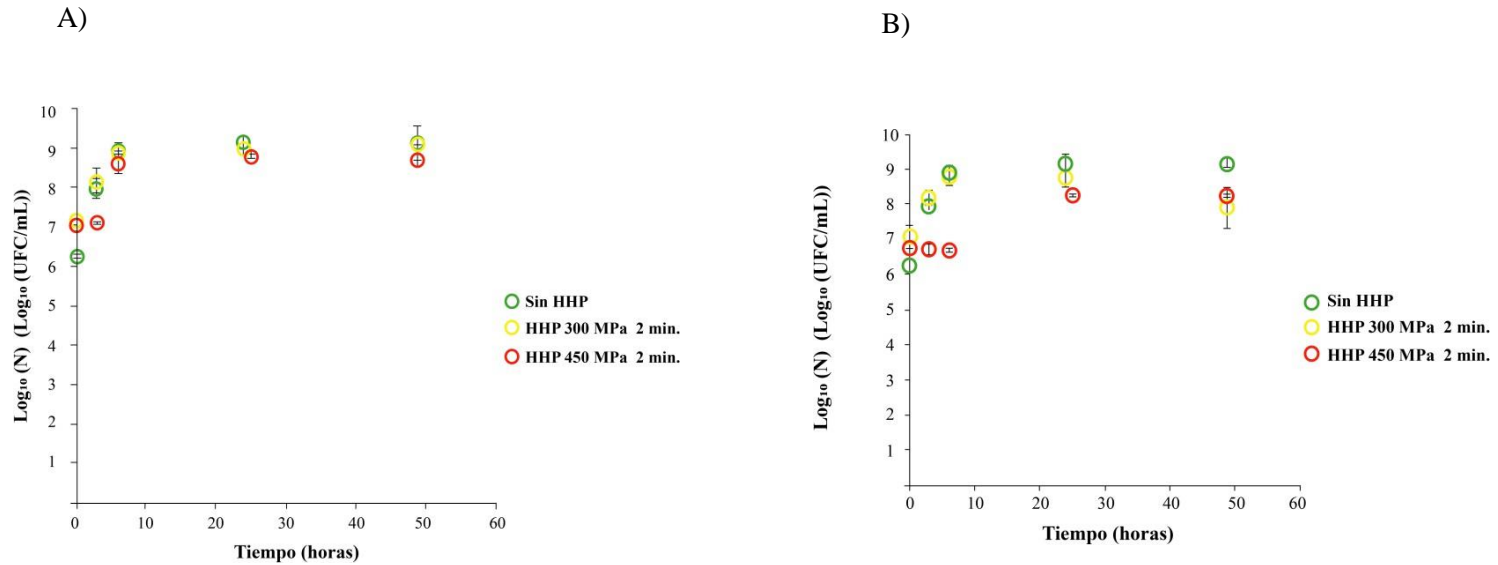
Con objeto de disponer de una referencia para ver si existe algún efecto sinérgico entre la alta presión y el quitosano de crustáceo o de insecto, las células de *Salmonella* se sometieron a las siguientes condiciones de tratamiento por alta presión hidrostática: 300 y 450 MPa durante 2 minutos (estos son tratamientos realmente suaves para lo que en general se viene aplicando en la industria). Como era de esperar, los resultados indican que estos tratamientos tuvieron un efecto limitado de inactivación en cuanto al número de reducciones decimales conseguidas tanto en el medio sin acidificar (C) como en medio acidificado con ácido acético (AC) (Tabla VI.3.1). No se observaron diferencias significativas para ninguno de los tratamientos aplicados entre las muestras control (C) y control ácido (AC), ni entre estas mismas muestras tratadas a las distintas presiones (300 MPa y 450 MPa). Por lo tanto, los tratamientos de presión elegidos no son capaces de inactivar *S. Typhimurium* ni en la muestra control (C) ni en el control ácido (AC).

**Tabla VI.3.1.** Inactivación de *S. Typhimurium* como consecuencia del tratamiento por HHP, expresado como  $\log_{10}(N_i/N_0) \pm$  desviación estándar en las diferentes matrices estudiadas.

Tratamiento	<b>*Log<sub>10</sub> (N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>) ± Desviación estándar</b>	
	<b>300 MPa 2 min</b>	<b>450 MPa 2 min</b>
<b>C</b>	0,19 ± 0,15 <sup>(a, A)</sup>	0,16 ± 0,05 <sup>(a, A)</sup>
<b>AC</b>	0,18 ± 0,14 <sup>(a, A)</sup>	0,37 ± 0,11 <sup>(a, A)</sup>
<b>QC</b>	0,95 ± 0,10 <sup>(b, A)</sup>	1,90 ± 0,23 <sup>(b, B)</sup>
<b>QI</b>	2,22 ± 0,53 <sup>(c, A)</sup>	4,10 ± 0,33 <sup>(c, B)</sup>

\*Log<sub>10</sub> (N<sub>i</sub>/N<sub>0</sub>): El log<sub>10</sub> de la concentración inicial de *S. Typhimurium* (sin tratar con HHP) (N<sub>i</sub>) (UFC/mL) entre la concentración de *S. Typhimurium* a tiempo 0 horas tras el tratamiento de 300 ó 450 MPa (N<sub>0</sub>) (UFC/mL).

ANOVA y post-hoc HSD de Tukey ( $p \leq 0,05$ ): las diferencias significativas entre cada tipo de muestra (C: control a pH 7,3; AC: control ácido a pH 6,2; QC: quitosano de crustáceo; QI: quitosano de insecto) se indican en letras minúsculas por columnas para cada tratamiento, mientras que las diferencias significativas entre cada tratamiento de altas presiones para una muestra determinada se indican con letras mayúsculas por filas para cada sustrato.



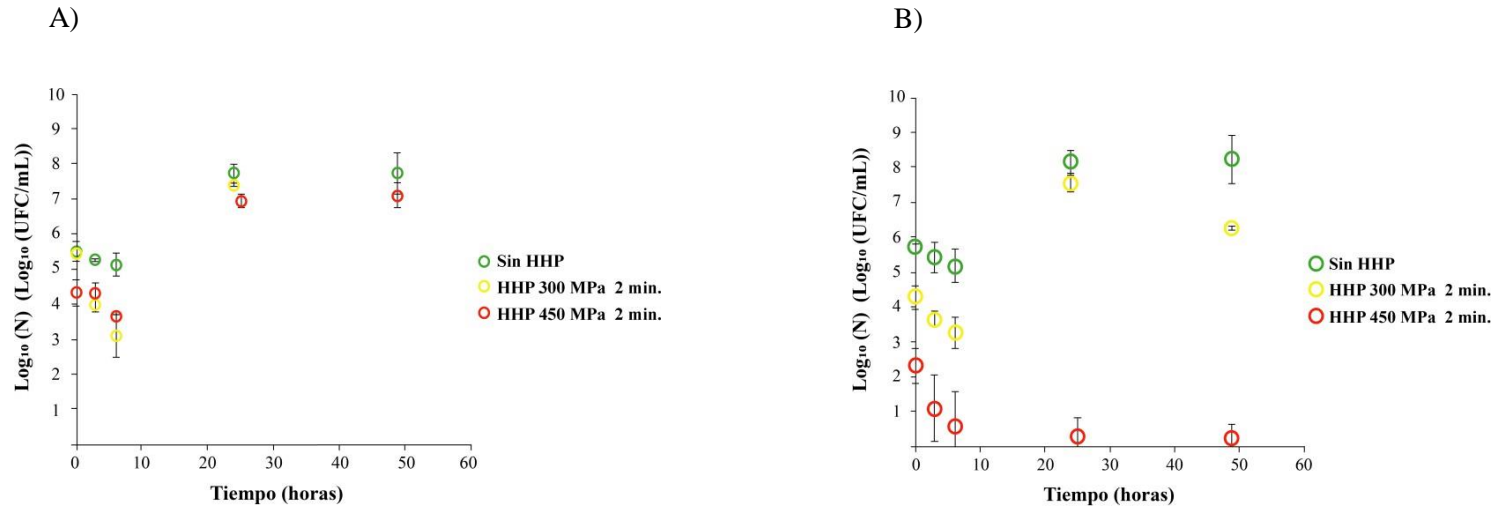
**Figuras VI.3.1.** Curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* en medio control (A) y control ácido (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa (2 minutos), y a 450 MPa (2 minutos), durante 49 horas de incubación a 37 °C. Cada círculo representa un valor promedio de Log<sub>10</sub> (N) ± desviación estándar (barras de error) para cada tiempo, siendo N la concentración de *S. Typhimurium* (UFC/mL) (ANOVA y post-hoc HSD de Tukey ( $p \leq 0,05$ ))

Las figuras VI.3.1 A y B muestran el crecimiento de *S. Typhimurium* en el control (C) (Figura VI.3.1 A) y en el control ácido (AC) (Figura VI.3.1 B) tratados con 300 MPa y 450 MPa en comparación con la muestra sin tratar durante 49 horas de incubación a 37 °C. En ambos controles (C y AC) se observa que la muestra tratada a 300 MPa 2 min tiene un crecimiento similar a la muestra sin tratar, excepto a la hora 49 para el control AC. Sanz-Puig et al. (2017) observaron también una tendencia similar para el grupo control (agua de peptona) sin y con tratamiento de HHP (200 MPa durante 2 minutos) e incubación a 37 °C, produciéndose un crecimiento de *S. Typhimurium* de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos en tan sólo 8 horas. Sin embargo, un tratamiento de intensidad superior (450 MPa, 2 min) produce en ambas muestras un aumento de la fase de latencia (3 horas para el control (C) y 6 horas para el control ácido (AC)).

### **VI.3.2.3. Efecto combinado del quitosano y alta presión hidrostática (HHP) sobre *S. Typhimurium***

El efecto combinado de las HHP y quitosano se puede apreciar en la figura A y B.





**Figuras VI.3.2.** Curvas de crecimiento de *S. Typhimurium* en medio con quitosano de crustáceo (A) y medio con quitosano de insecto (B) sin tratar por HHP, tratadas a 300 MPa y a 450 MPa durante 49 horas de incubación a 37 °C. Cada círculo representa un valor promedio de  $\text{Log}_{10} (N) \pm$  desviación estándar (barras de error) para cada tiempo, siendo N la concentración de *S. Typhimurium* (UFC/mL). (ANOVA y post-hoc HSD de Tukey ( $p \leq 0,05$ )).

Los tratamientos de alta presión sobre las muestras suplementadas con quitosano produjeron reducciones decimales logarítmicas significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la población de *S. Typhimurium* respecto a los controles (Tabla VI.3.1). Cuando se aplicó una presión de 300 MPa durante 2 minutos en la muestra de quitosano de crustáceo (QC), la población microbiana se redujo en 0,95 ciclos, mientras que la presión en la muestra con quitosano de insecto provocó una reducción significativa mayor, de 2,22 ciclos logarítmicos. Las reducciones logarítmicas fueron mayores a 450 MPa durante 2 minutos, 1,9 ciclos logarítmicos para la muestra con quitosano de crustáceo y de 4,10 ciclos para la muestra de quitosano de insecto.

Cuando las muestras con quitosano (de crustáceo e insecto) tratadas a 300 MPa se incubaron a 37 °C durante 49 horas, se puso de manifiesto un efecto bacteriostático del tratamiento combinado pues aunque se observó una reducción de la población microbiana durante las primeras 6 horas de incubación, a la hora 49 se alcanzó una concentración de microorganismo similar al inóculo inicial, de modo que dicho tratamiento retrasó el crecimiento de *Salmonella* durante el estudio.

En el caso del tratamiento a 450 MPa, las muestras de quitosano de crustáceo mostraron un efecto bacteriostático similar al observado a 300 MPa. Sin embargo, las muestras con quitosano de insecto sometidas a 450 MPa e incubadas a 37 °C mostraron un comportamiento diferente a las muestras sin tratar por HHP y tratadas a 300 MPa. Para las muestras con quitosano de insecto se apreció un efecto notablemente bactericida de casi 7 ciclos logarítmicos respecto al inóculo inicial (Figura VI.3.2 B), lo que viene a significar una inactivación completa de *S. Typhimurium*. Estos resultados sugieren un efecto sinérgico del tratamiento por altas presiones hidrostáticas en combinación con el quitosano de insecto, pues la aplicación combinada de

ambos tratamientos produjo una reducción significativamente mayor que la conseguida por la aplicación de los tratamientos de manera individual.

El efecto conjunto de la alta presión hidrostática y los antimicrobianos naturales ha sido estudiado con anterioridad por otros autores. Sanz-Puig et al. (2017) observaron reducciones de entre 4 y 5 ciclos logarítmicos en *S. Typhimurium* que había recibido un tratamiento por alta presión hidrostática tras 5 horas de incubación a 37 °C en medios suplementados con infusión de mandarina ó de coliflor. Los autores describieron un efecto sinérgico de la sustancia natural y el tratamiento de alta presión hidrostática. Oliveira et al. (2019) estudiaron el efecto de ácido ferúlico (1 mM) ó gálico (10 mM), ácidos presentes de manera natural en frutas y granos, en combinación con tratamientos de presión sobre *E. coli* O157:H7. Sus resultados indicaron que no había un efecto adicional debido a la presencia de ácido ferúlico en los medios de crecimiento inoculados y tratados a 250 MPa (1-30 minutos). Sin embargo, en el caso de la combinación del tratamiento de presión con ácido gálico observaron una reducción de 5 ciclos logarítmicos con respecto al control tratado sólo con presión en tan solo 7,5 minutos de incubación, por tanto, se concluyó que la presencia de ácido gálico en zumo de manzana tratado con 250 MPa aumentó la inactivación de *E. coli* O157:H7.

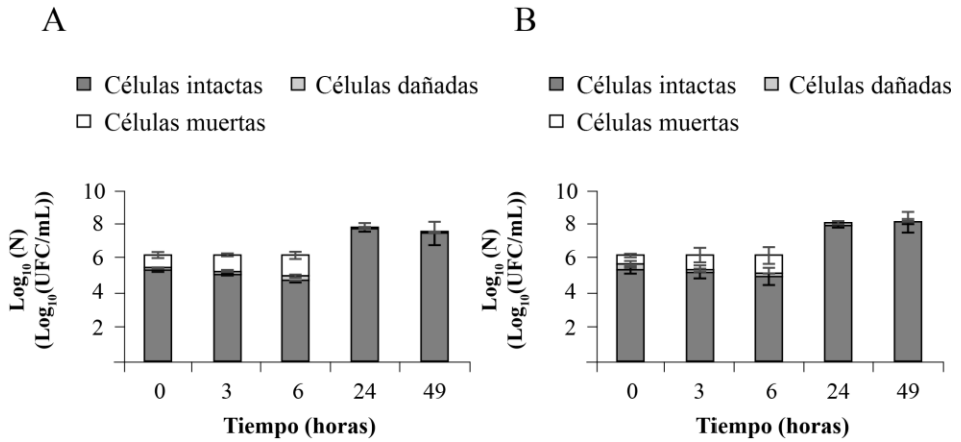
S. Kumar et al. (2009) indicaron que el efecto bactericida conjunto puede incrementarse al aumentar el nivel de presión. A pesar de estos resultados, no siempre aparecen efectos sinérgicos al combinar antimicrobianos naturales y altas presiones hidrostáticas, probablemente debido a que dicho efecto depende del microorganismo, así como del tipo, dosis y modo de acción de la sustancia antimicrobiana (Berdejo et al, 2019; Bleoancă et al., 2016).

Los resultados del estudio también arrojan información importante en

relación al quitosano de insecto. Así como en los estudios del efecto antimicrobiano de los dos quitosanos del capítulo 2 dejaron claro que el quitosano de crustáceo tenía en algunos casos más capacidad antimicrobiana que el quitosano de insecto, al combinarlos con la alta presión, el quitosano de insecto mostró una mayor actividad bactericida que el de crustáceo. El resultado apoya el uso del quitosano en combinación con la alta presión hidrostática para controlar *Salmonella* en alimentos. Dado que en general el efecto de los tratamientos de conservación depende en gran medida del microorganismo, sería interesante seguir explorando esta vía de tratamientos combinados alta presión-quitosano de insecto, con otros microorganismos patógenos con objeto de caracterizar la naturaleza del efecto de dichos procesos combinados de forma más extensa.

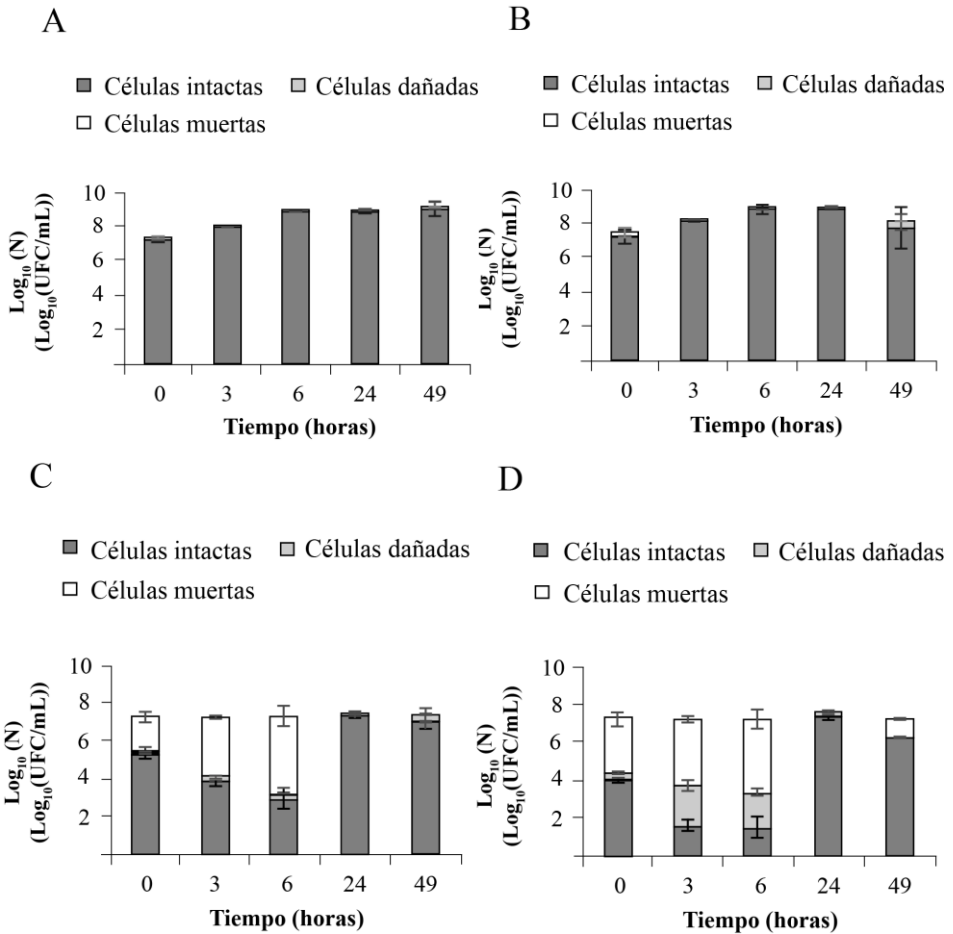
#### **VI.3.2.4. Evaluación de la población celular dañada expuesta a quitosano y/o tratamientos de alta presión hidrostática (HHP)**

La exposición de *S. Typhimurium* a 0,15% de quitosano de insecto o de crustáceo sin tratamiento de altas presiones hidrostáticas no produjo un nivel apreciable de células dañadas respecto al total de la población que sobrevivió al tratamiento (Figuras VI.3.3A y VI.3.3 B).



**Figuras VI.3.3.** Concentración de células dañadas de *S. Typhimurium* expuestas a 0,15% de quitosano de crustáceo (A) y quitosano de insecto (B) sin tratamiento de altas presiones. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

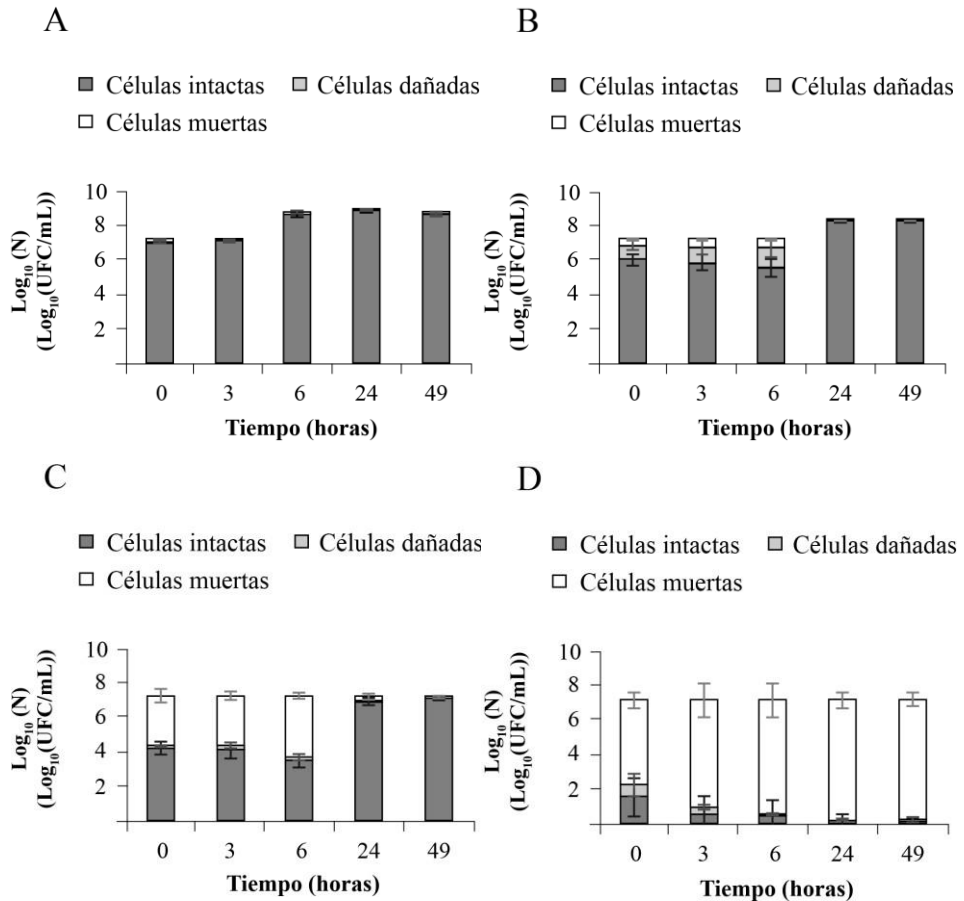
Después del tratamiento de 300 MPa durante 2 minutos, sólo la exposición de *S. Typhimurium* a quitosano de insecto mostró un nivel relevante de células dañadas, 2,06 y 1,80 ciclos logarítmicos a las 3 y 6 horas de incubación respectivamente (Figura VI.3.4). La mayoría de estas células dañadas se recuperaron a las 24 horas disminuyendo drásticamente su número.



**Figura VI.3.4.** Análisis de células dañadas de *S. Typhimurium* tratadas a 300 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C. A: control (blanco) a pH  $7,3 \pm 0,2$ ; B: control ácido a pH  $6,2 \pm 0,2$ ; C: 0,15% quitosano de crustáceo a pH  $6,2 \pm 0,2$ ; D: 0,15% quitosano de insecto a pH  $6,2 \pm 0,2$ ). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

Tras el tratamiento de 450 MPa durante 2 minutos, se observó una población importante de células dañadas en el medio control ácido (Figura VI.3.5). Esta subpoblación de células dañadas de 0,80-1,19 ciclos se mantuvo durante al menos las 6 primeras horas, coincidiendo con el incremento en la fase de

latencia descrito anteriormente, aunque prácticamente las células dañadas desaparecieron a las 24 horas de incubación. Esto sugiere que puede haber un proceso de reparación celular con el tiempo cuando las condiciones de incubación son favorables.



**Figura VI.3.5.** Análisis de la población de *S. Typhimurium* tratada a 450 MPa - 2 minutos durante 49 horas de incubación a 37 °C. A: control (blanco) a pH 7,3 ± 0,2; B: control ácido a pH 6,2 ± 0,2; C: 0,15% quitosano de crustáceo a pH 6,2 ± 0,2; D: 0,15% quitosano de insecto a pH 6,2 ± 0,2). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio.

Cuando las células de *S. Typhimurium* se inocularon en quitosano de crustáceo y recibieron un tratamiento de 450 MPa durante 2 minutos, también apareció una pequeña proporción de células dañadas subletalmente, y como en los casos anteriores, dichas células dañadas se repararon prácticamente tras 24 horas de incubación. Sin embargo, cuando *S. Typhimurium* inoculada en quitosano de insecto se trató a 450 MPa durante 2 minutos, el daño subletal fue mayor (0,71 ciclos) a  $t = 0$  horas. Esta población no parece que se repare pues desaparece a la vez que la población de las células intactas durante el periodo de almacenamiento. Este resultado refleja un cambio sustancial en el comportamiento de estos procesos respecto al que se observó cuando el tratamiento de alta presión se llevó a cabo a 300 MPa. Una explicación para este comportamiento podría estar relacionada con la intensidad del tratamiento, así, el daño subletal es tan intenso que, a no ser que las células se pongan en un medio favorable de recuperación, no pueden reparar el daño en la presencia de quitosano de insecto. Una vez más se observa el comportamiento diferente del quitosano de insecto respecto al de crustáceo en presencia de la alta presión hidrostática, principalmente a los tratamientos con alta presión hidrostática más intensos. El comportamiento observado después del tratamiento a 450 MPa es muy similar al indicado por Sanz-Puig et al. (2017). En este trabajo, se puso de manifiesto que las células de *S. Typhimurium* dañadas por el tratamiento con alta presión terminaron muriendo en el medio que contenía extractos vegetales.

### **VI.3.3. Conclusiones**

El tratamiento de presión de 300 MPa 2 min no tuvo efecto ni bactericida ni bacteriostático en ausencia de quitosano (control y control ácido), mientras que el incremento de la intensidad del tratamiento hasta 450 MPa alargó la duración de las fase de latencia (3 y 6 horas para control y control ácido respectivamente).



El mismo tratamiento de 300 MPa en presencia de quitosano de insecto o crustáceo produjo un efecto bacteriostático, impidiendo el crecimiento durante las 49h que duró el estudio, mientras que un incremento de la intensidad del tratamiento hasta 450 MPa en presencia de quitosano de insecto tuvo un efecto bactericida inactivando hasta 7 ciclos logarítmicos de *S. Typhimurium*.

Estos tratamientos combinados producen daño celular aunque en el caso del tratamiento a 450 MPa en el medio conteniendo quitosano de insecto, esas células dañadas no pudieron reparar el daño y finalmente murieron.

La combinación de un tratamiento suave de HHP (450 MPa, 2 min) en presencia de una solución de quitosano de insecto (0,15%) se postula como una buena alternativa para la conservación de alimentos mínimamente procesados.







---

## *Capítulo 4: Efecto antimicrobiano de espirulina frente a S. Typhimurium in vivo*

---

### **VI.4.1 Introducción**

La mayoría de los trabajos en los que se estudia el efecto antimicrobiano de sustancias naturales se llevan a cabo *in vitro* pues es la situación más sencilla cuando se desea llevar a cabo un trabajo prospectivo. Sin embargo, en muchas ocasiones interesa saber el efecto que tiene el antimicrobiano en el intestino de las personas o animales (*in vivo*), efecto que puede ser diferente al que presenta *in vitro*. Este conocimiento puede ayudar a formular diferentes tipos de alimentos, para humanos y para animales de granja.

Como se indicó en el capítulo 1, es necesario disponer de un organismo modelo para un antimicrobiano en concreto y patógeno. En este sentido, *C. elegans* se ha utilizado en diferentes estudios de infección por patógenos en los que se puede ver el efecto del microorganismo sobre su esperanza de vida (Aballay et al., 2000; Labrousse et al., 2000).

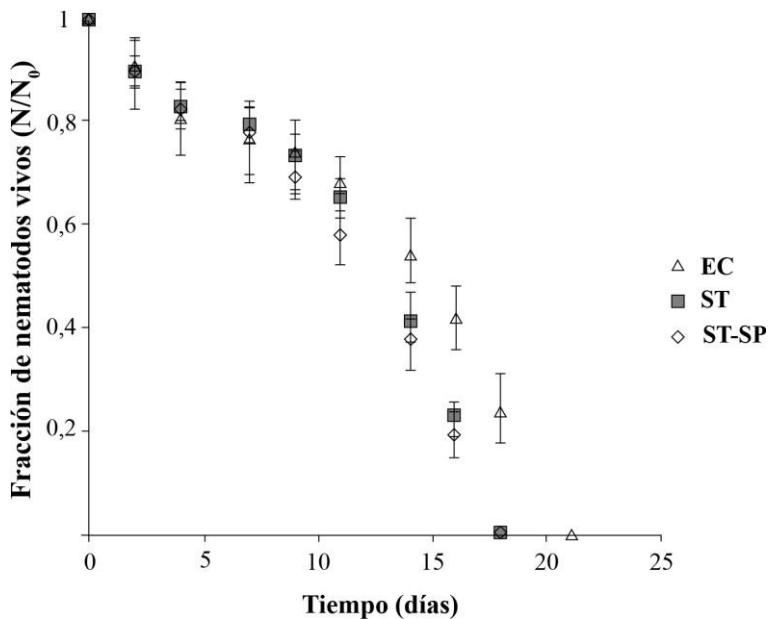
En el capítulo 1 de la presente tesis se concluyó que el extracto de espirulina, en la concentración estudiada ejerció cierto efecto positivo sobre su supervivencia. En este capítulo se investiga el efecto potencial que dicha sustancia natural pudiera tener sobre la supervivencia del nematodo infectado con *S. Typhimurium* así como en la concentración de *Salmonella* en su

intestino.

## VI.4.2 Resultados y discusión

### VI.4.2.1 Efecto del extracto de espirulina sobre la supervivencia y esperanza de vida de *C. elegans* infectados

La supervivencia del nematodo infectado en presencia o ausencia del extracto de espirulina se puede apreciar en la figura VI.4.1.



EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

ST: *C. elegans* en medio NGM infectados con *Salmonella* Typhimurium

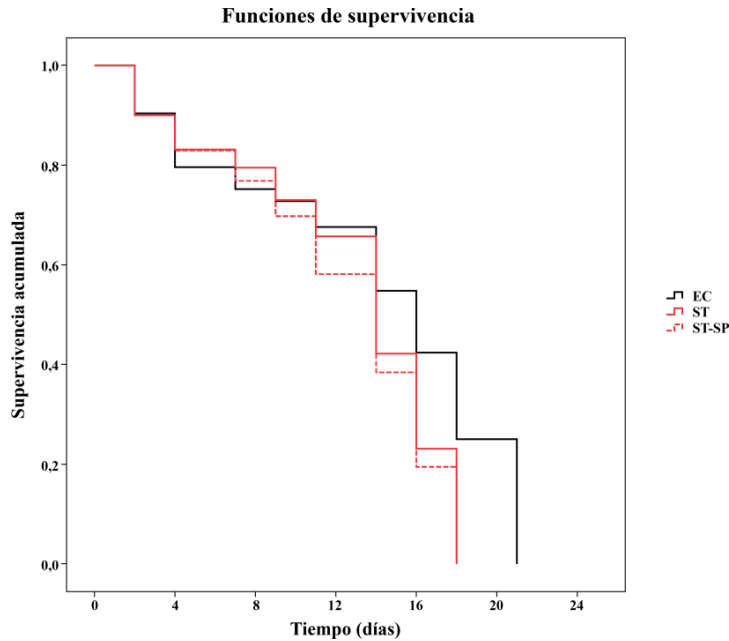
ST-SP: *C. elegans* en medio NGM con extracto de espirulina al 0,1% (p/v) infectados con *Salmonella* Typhimurium

**Figura VI.4.1.** Curvas de supervivencia para *C. elegans* con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de espirulina. Cada punto representa el promedio de la fracción de nematodos vivos a ese tiempo  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

Tal como se puede ver en la figura VI.4.1, infectar al nematodo con *Salmonella* influyó en el número de gusanos que mueren por intervalo de tiempo a partir del día 14 en adelante, coincidiendo con el periodo de senescencia de los nematodos. Este comportamiento parece indicar que existe infección del nematodo por *Salmonella* y que los mecanismos de defensa del nematodo no son suficientes para combatir la enfermedad sobre todo cuando el nematodo envejece, con un posible deterioro del sistema inmunitario que se aloja alrededor del tracto digestivo. Es importante tener en cuenta que el efecto de la infección por *Salmonella* coincide prácticamente con la mitad de la esperanza de vida del nematodo, que es, bajo circunstancias normales, de aproximadamente 20 días.

Si comparamos la supervivencia de *C. elegans* mantenido en el medio con *Salmonella* con la supervivencia del nematodo mantenido en medio con *Salmonella* y espirulina, no se apreció ningún efecto positivo en la supervivencia del nematodo como consecuencia de la presencia de espirulina en el medio de alimentación. De acuerdo a estos resultados, se podría concluir que la espirulina no tiene capacidad antimicrobiana *in vivo* frente a *Salmonella*, o que si la tiene, no es capaz de incentivar al sistema inmunológico del nematodo para reaccionar frente a la infección por *Salmonella* y aumentar su supervivencia.





**Figura VI.4.2.** Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de espirulina.

Las funciones estimadas de supervivencia representada en la figura VI.4.2 muestran una probabilidad de supervivencia mayor para la población alimentada con *E. coli* OP50 en comparación con el resto de grupos en el día 14 del estudio, lo cual indica, al igual que en la figura VI.4.1, que la infección por *Salmonella* afecta negativamente a la supervivencia de *C. elegans*, siendo este efecto más pronunciado a partir del día 14 para ambas poblaciones alimentadas con *Salmonella*. El test de Tarone-Ware demuestra que dichas diferencias entre los grupos sin infectar (EC) e infectados son significativas ( $p < 0,001$ ), sin embargo, los grupos infectados no se muestran significativamente diferentes ( $\chi^2 = 1,4$ , grados de libertad = 2,  $p$ -valor = 0,238) (Tabla VI.4.1)

**Tabla VI.4.1.** Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina.

TEST	TRATAMIENTOS		ESTADÍSTICO ( $\chi^2$ )	GRADOS DE LIBERTAD	P- VALOR*
Log-Rank	EC	ST	34,0	2	< 0,001
		ST-SP	37,5		< 0,001
	ST	ST-SP	1,4		0,231
Breslow	EC	ST	13,7		< 0,001
		ST-SP	17,7		< 0,001
	ST	ST-SP	1,3		0,255
Tarone-Ware	EC	ST	22,2	< 0,001	
		ST-SP	26,3	< 0,001	
	ST	ST-SP	1,4	0,238	

\*Las funciones de supervivencia de cada test fueron significativamente distintas si  $p \leq 0,05$

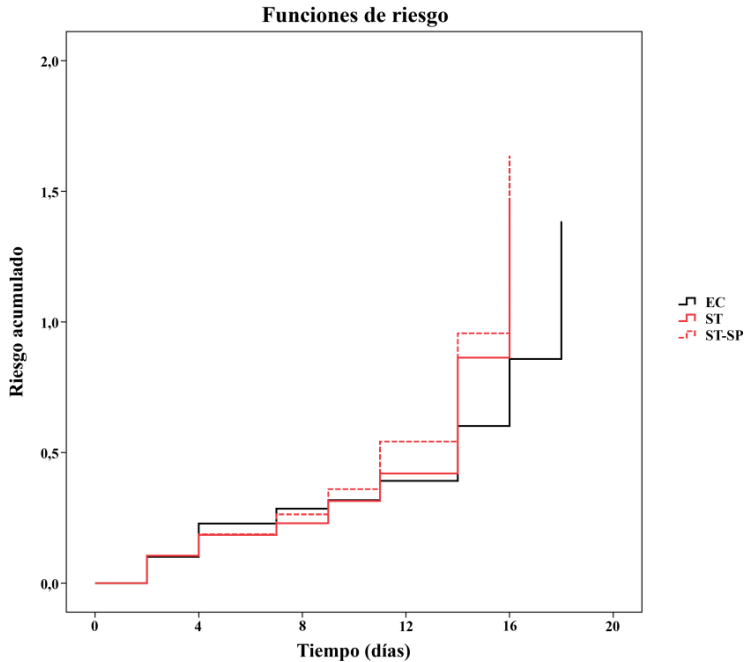
La información relativa a los percentiles estimados de la distribución de supervivencia de los nematodos viene recogida en la tabla VI.4.2.

**Tabla VI.4.2.** ANOVA y test post-hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de *C. elegans* en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de espirulina.

PERCENTIL (%)	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DÍAS ± ERROR ESTÁNDAR)		
	EC	ST	ST-SP
75	7,4 ± 3,5 <sup>a</sup>	8,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	7,2 ± 2,0 <sup>a</sup>
50	14,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	13,1 ± 1,2 <sup>b</sup>	12,2 ± 1,4 <sup>b</sup>
25	17,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	15,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	15,4 ± 1,2 <sup>b</sup>

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p \leq 0,05$ ).

La tabla VI.4.2 refleja que el 50% de la población alimentada con *E. coli* OP50 sobrevivió significativamente más tiempo (14,8 días) que la población infectada (ST) (13,1 días) y la población infectada y alimentada con extracto de espirulina (ST-SP) (12,2 días).



**Figura VI.4.3.** Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de espirulina.

Las funciones estimadas de riesgo acumulado (Figura VI.4.3) muestran un riesgo de muerte similar para todas las poblaciones del estudio hasta el día 11, momento a partir del cual la mortalidad de los nematodos infectados aumenta a lo largo del tiempo respecto a la muestra control.

En resumen, parece que el extracto de espirulina en el medio de alimentación de *C. elegans* infectados con *Salmonella Typhimurium* no afecta a *Salmonella* y, por consiguiente, no mitiga su efecto sobre la supervivencia ni longevidad del nematodo.

Estos resultados contrastan con los encontrados por Palacios-Gorba et al. (2020), quienes demostraron una mejoría en la supervivencia de *C. elegans* infectados con *Helicobacter pylori* cuando se alimentaron con fucoidina, sustancia presente en las algas pardas. No obstante es preciso indicar que la extensión del efecto antimicrobiano de las sustancias depende del microorganismo en particular.

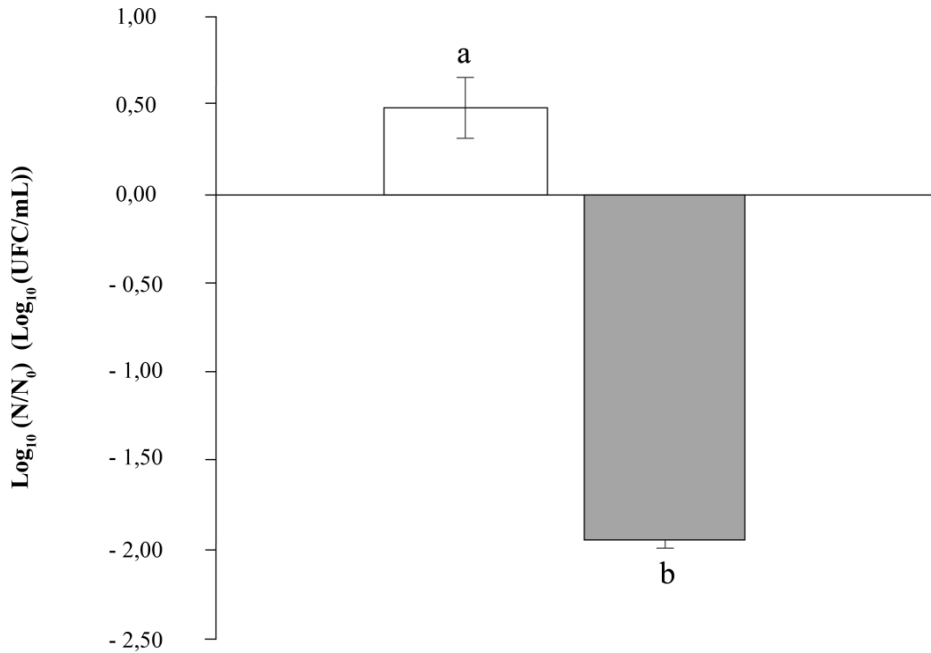
A pesar de que no se haya detectado un efecto beneficioso de la espirulina en los nematodos infectados con *Salmonella*, hay estudios *in vitro* en los que se describe la capacidad antimicrobiana de algunas microalgas, entre ellas *Spirulina*, debido a ciertos compuestos químicos presentes en los extractos. Mendiola et al. (2007) probaron extractos etanólicos de *Spirulina platensis* frente a bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*), Gram negativa (*Escherichia coli*), *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, indicando que eran efectivos frente a dichos microorganismos. Es posible que el extracto acuoso de *Spirulina*, que ha sido utilizado en el presente trabajo, no posea actividad antimicrobiana, o bien esta sea limitada debido al procedimiento de extracción. En este sentido, Al-Ghanayem (2017) estudió el efecto antimicrobiano de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de *Spirulina platensis* frente a 4 tipos de bacterias Gram positivas y seis tipos de bacterias Gram negativas. El autor encontró que el extracto acuoso de *Spirulina platensis* no mostró ninguna actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados, mientras que el extracto metanólico fue el que tuvo la mayor actividad antimicrobiana frente a dichos microorganismos, especialmente frente a bacterias Gram positivas. Sin embargo, Abdo et al. (2012) estudiaron el efecto de extractos alcohólicos y acuosos de algas frente a diferentes microorganismos, y los resultados obtenidos indicaron que ambos tipos de extractos de *Spirulina* tuvieron una actividad inhibitoria detectable en los microorganismos estudiados, incluyendo *Salmonella*. En definitiva, parece que no hay

conclusiones claras respecto al efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de *Spirulina*.

#### **VI.4.2.2 Efecto del extracto de espirulina en *S. Typhimurim* en el tracto digestivo de *C. elegans***

Teniendo en cuenta que los resultados de algunos trabajos de investigación parecen indicar que el extracto acuoso de *Spirulina* puede tener algún efecto antimicrobiano, y apoyándonos en los resultados del capítulo 1 donde se observó un efecto beneficioso de la espirulina en la supervivencia del nematodo, se decidió profundizar en la investigación tratando de dilucidar si la espirulina puede tener alguna actividad antimicrobiana en el intestino del nematodo infectado con *Salmonella*. Para ello se estudió cómo evoluciona la concentración microbiana de *S. Typhimurium* en el intestino del nematodo en función de que se alimente en un medio con o sin extracto de espirulina.

La figura VI.4.4 muestra la evolución de *Salmonella* en el intestino de nematodos infectados a las 48 horas posteriores de la infección. Los recuentos de *Salmonella* en el intestino de los nematodos se incrementaron en 0,40 ciclos logarítmicos respecto al recuento inicial cuando se alimentaron en un medio que no contenía el extracto acuoso de espirulina. El resultado indica que hay una progresión natural de la infección. Sin embargo, los recuentos de *Salmonella* en el intestino de los nematodos disminuyeron en 1,85 ciclos logarítmicos respecto al recuento inicial en la población de *C. elegans* infectada con *Salmonella* y alimentada con espirulina.



**Figura VI.4.4.** Evolución de la carga microbiana en el intestino del nematodo alimentado (barra gris) y no alimentado (barra blanca) con espirulina a las 48 horas post-infección. Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio. Test t-student ( $p \leq 0,05$ ).

Los resultados de este capítulo sugieren que el extracto acuoso de espirulina tiene un efecto a nivel del intestino del animal lo que permite reducir la colonización intestinal en *C. elegans* a las 48 horas post-infección. El mecanismo de este efecto es aún desconocido, quizá en el intestino del nematodo existan componentes químicos que favorezcan la acción de la espirulina frente a *Salmonella*. En mamíferos, se conoce que la *Spirulina* funciona como activador del sistema inmune, activando células T y B, estimulando anticuerpos y citoquinas, acumulándose en tejidos donde se encuentran células natural killer (NK) e incrementando la actividad fagocítica de macrófagos (Q. Wu et al., 2016). La *Spirulina* también parece potenciar la respuesta del sistema inmune en invertebrados, demostrado en el estudio de

Tayag et al. (2010), en el que se mencionó que el extracto acuoso y caliente de *Spirulina* mejoró la respuesta inmune del crustáceo *Litopenaeus vannamei*, incrementando la resistencia frente a la infección bacteriana. Es posible que se produzca también una estimulación del sistema inmunológico del nematodo que reacciona eliminando *Salmonella*, aunque no lo suficiente como para que se refleje en la supervivencia como se indicó anteriormente.

### **VI.4.3 Conclusiones**

El efecto de extracto acuoso de espirulina en la supervivencia de *C. elegans* infectados con *S. Typhimurium* no supuso una mejoría en su supervivencia.

Los estudios de lisis llevados a cabo para determinar el efecto antimicrobiano en el intestino de *C. elegans* demuestran que, tras 48 horas de incubación en presencia del extracto, la concentración del patógeno en el tracto digestivo del nematodo disminuyó. Con estos resultados se podría decir que *C. elegans* es un buen modelo de infección por patógenos alimentarios y para estudiar el efecto que determinados componentes naturales pueden tener sobre dicha infección.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el estudio abren la puerta al posible uso de estos extractos para el diseño de alimentos que tengan la propiedad de controlar a ciertos microorganismos patógenos a nivel intestinal, lo cual sería muy interesante por ejemplo en alimentación animal.







---

## *Capítulo 5: Efecto antimicrobiano de Brassica oleracea var. botrytis (coliflor) frente a S. Typhimurium in vivo*

---

### **VI.5.1 Introducción**

Siguiendo con los estudios de evaluación de antimicrobianos naturales *in vivo* y dado que *C. elegans* puede ser una buena herramienta para estudiar la infección y el efecto de antimicrobianos como se desprende de los resultados del capítulo anterior, en este capítulo se aborda el estudio del efecto antimicrobiano de un extracto acuoso de coliflor a nivel de su posible efecto en la supervivencia y esperanza de vida, y directamente en el intestino de *C. elegans*.

La elección del extracto acuoso de coliflor viene motivado por estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación y otros investigadores en los que se vió *in vitro* que dicho extracto redujo la carga microbiana de patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 verotoxigénica y *Listeria monocytogenes* tras la exposición a subproductos de la especie *Brassica oleracea* (Brandi et al., 2006; Sanz-Puig et al., 2015).

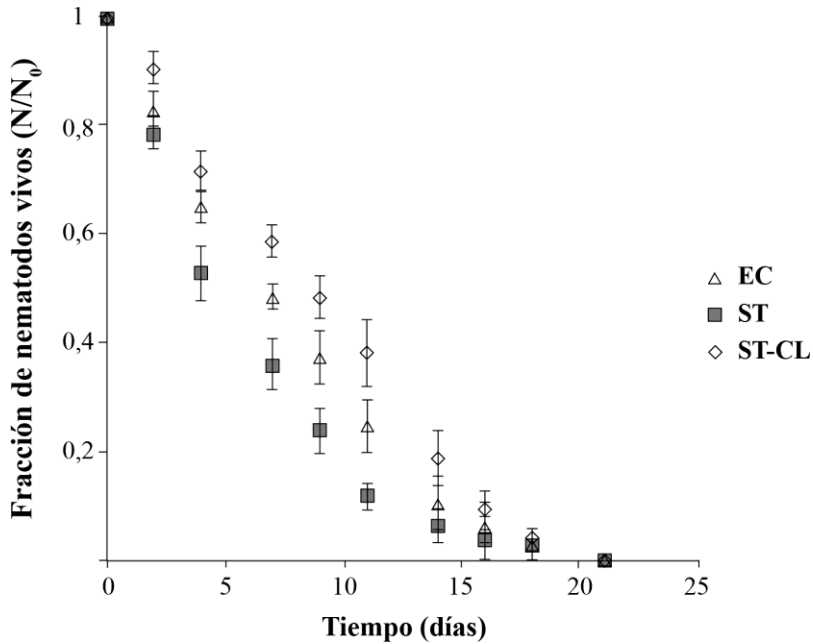


## **VI.5.2 Resultados y discusión**

### **VI.5.2.1 Efecto del extracto de coliflor sobre la supervivencia y esperanza de vida de *C. elegans* infectados**

Se procedió a un ensayo en el que los nematodos infectados se alimentaron en un medio suplementado con extracto de coliflor. Los tratamientos diseñados para este ensayo quedan recogidos en la tabla V.5.2 de la sección material y métodos.

La figura VI.5.1 muestra la fracción de supervivientes de *C. elegans* (N/N<sub>0</sub>) alimentados en los distintos medios del estudio.



EC: *C. elegans* en medio NGM alimentados con *E. coli* OP50

ST: *C. elegans* en medio NGM infectados con *Salmonella* Typhimurium

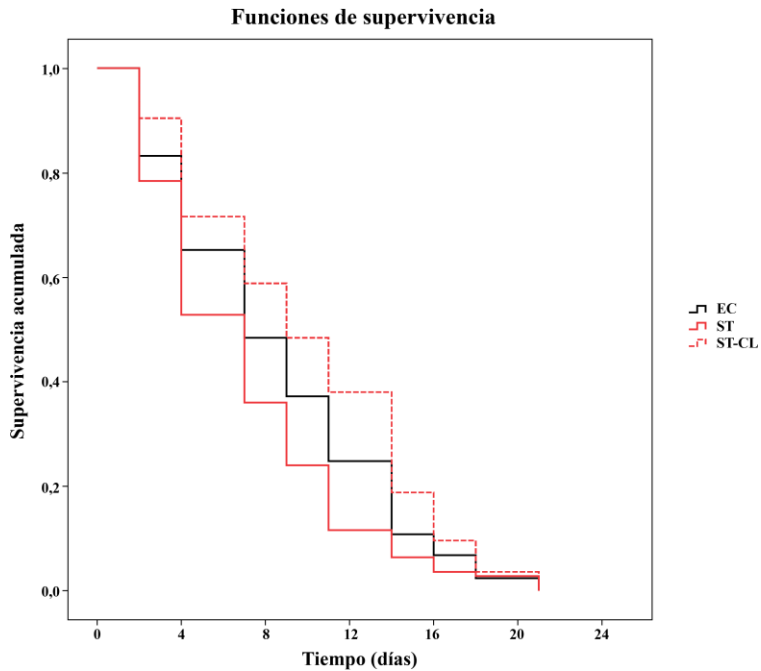
ST-CL: *C. elegans* en medio NGM con infusión de coliflor al 3 % (p/v) infectados con *Salmonella* Typhimurium

**Figura VI.5.1.** Curvas de supervivencia de *C. elegans* con diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de coliflor. Cada punto representa el promedio de la fracción de nematodos vivos a ese tiempo  $\pm$  desviación estándar (barras de error).

Hasta el día 16, la fracción de supervivientes infectados con *Salmonella* Typhimurium (ST) se redujo respecto a la población alimentada sólo con *E. coli* OP50 en medio NGM (EC) que no había sido infectada previamente. Sin embargo, los nematodos infectados y expuestos a extracto de coliflor (ST-CL), presentaron una mayor supervivencia que en ausencia del extracto (ST) hasta el día 16, e incluso su supervivencia alcanzó valores superiores a los de la población no

infectada (EC). Estos resultados indican que, el extracto de coliflor mejora la supervivencia de *C. elegans* en relación al control (EC), y también tiene efectos muy positivos en los nematodos infectados. El extracto de coliflor parece contribuir a la defensa del nematodo frente a *Salmonella*, bien por una acción antimicrobiana en el intestino del nematodo o bien por incentivar la defensa natural del nematodo frente a este patógeno.

Después de aplicar el análisis estadístico de Kaplan Meier por intervalos, las funciones estimadas de supervivencia se pueden observar en la figura VI.5.2. Reflejan lo mismo que se apreciaba en las curvas de supervivencia, una clara mayor supervivencia para el grupo infectado alimentado con extracto de coliflor que para el grupo infectado alimentado en ausencia de coliflor (ST) o el grupo control alimentado sólo con *E. coli* OP50 (EC) hasta el período de días del 16 al 18, aunque apenas se aprecia una supervivencia superior de ST-CL para los días posteriores del estudio. En definitiva, tal como indica el test de Tarone-Ware, las funciones de supervivencia de los grupos de estudio se consideran estadísticamente distintas entre sí (Tabla VI.5.1)



**Figura VI.5.2.** Funciones estimadas de supervivencia de los grupos del estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de coliflor.

A continuación se recoge el análisis para comparar las funciones de supervivencia de los grupos de estudio (Tabla VI.5.1)



**Tabla VI.5.1.** Análisis comparativo de las funciones de supervivencia de los grupos considerados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor.

TEST	TRATAMIENTOS		ESTADÍSTICO ( $\chi^2$ )	GRADOS	*P-VALOR
				DE LIBERTAD	
Log-Rank	EC	ST	10,5	2	0,001
		ST-CL	8,6		0,003
	ST	ST-CL	37,0		< 0,001
Breslow	EC	ST	11,3		0,001
		ST-CL	9,2		0,002
	ST	ST-CL	39,9		< 0,001
Tarone-Ware	EC	ST	12,0		0,001
		ST-CL	9,5		0,002
	ST	ST-CL	41,6		< 0,001

\*Las funciones de supervivencia de cada test fueron significativamente distintas si  $p \leq 0,05$

La tabla VI.5.2 muestra los percentiles de supervivencia del nematodo sujeto a los distintos regímenes de alimentación.

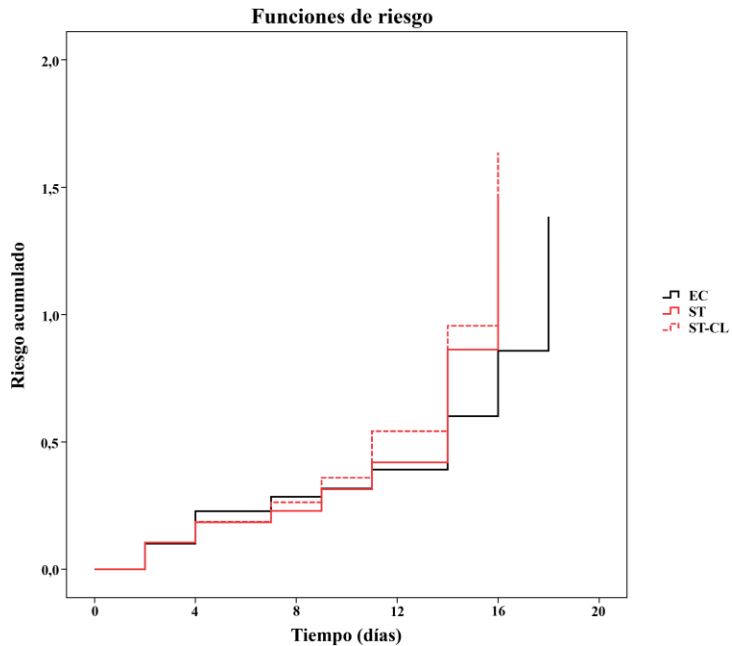
**Tabla VI.5.2.** ANOVA y test post- hoc HSD de Tukey para los valores de percentiles estimados para la distribución de supervivencia de *C.elegans* en los diferentes medios de alimentación empleados en el estudio de infección y tratamiento con extracto de coliflor.

PERCENTIL (%)	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DÍAS ± ERROR ESTÁNDAR)		
	EC	ST	ST-CL
75	2,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,6 ± 1,2 <sup>a</sup>
50	6,9 ± 1,8 <sup>ab</sup>	4,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,0 <sup>b</sup>
25	11,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	8,8 ± 1,6 <sup>b</sup>	13,0 ± 2,2 <sup>c</sup>

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre columnas ( $p \leq 0,05$ ).

El análisis de percentiles de supervivencia de los nematodos infectados indicó para el percentil 50 que el grupo infectado (ST) solo sobrevivió hasta los  $4,4 \pm 0,8$  días, duplicándose en la población infectada y alimentada con coliflor ( $8,8 \pm 2,0$  días). Además, el extracto de coliflor permitió que el 25% de la población infectada sobreviviera  $13,0 \pm 2,2$  días respecto a los  $8,8 \pm 1,6$  días de supervivencia para la población infectada no expuesta al extracto.

Respecto al riesgo de muerte, la figura VI.5.3 muestra las funciones estimadas de riesgo acumulado. Como se puede apreciar, el grupo infectado alimentado en ausencia del extracto de coliflor experimentó el mayor riesgo de muerte entre los tratamientos estudiados, con una velocidad de muerte máxima en el periodo del día 11 al 14. Por otro lado, la población expuesta al extracto presentó el menor riesgo de muerte de entre los tratamientos estudiados.



**Figura VI.5.3.** Funciones estimadas de riesgo acumulado de los grupos del estudio de infección con *S. Typhimurium* tratada con extracto de coliflor.

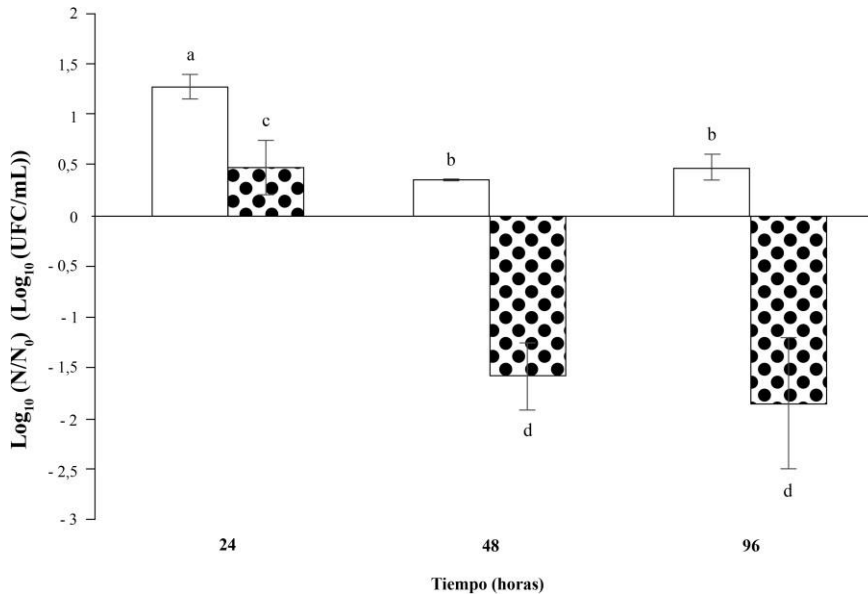
En cuanto a la supervivencia, cabe decir que en otros estudios se han descrito resultados similares, en los cuales la exposición de *C. elegans* infectados con *Staphylococcus aureus* a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de extractos acuosos de plantas como *Curcuma longa*, raíces de *Eurycoma longifolia*, hojas de *Orthosiphonstamineus* y semillas de *Silybum eburneum* prolongan la esperanza de vida del nematodo 72 horas después de haber sido infectados (C. Kong et al., 2014). Polifenoles como honokiol y magnolol presentes en especies de *Magnolia* aumentan la esperanza de vida en *C. elegans* infectados con bacterias gram negativas como *Vibrio cholerae*, de manera que los nematodos infectados alimentados en ausencia de dichos polifenoles murieron el día 8, mientras que la población tratada con honokiol y magnolol a distintas concentraciones murieron el día 9 y entre los días 10 y 11 respectivamente (Kim et al., 2015).

### VI.5.2.2 Efecto del extracto de coliflor en *S. Typhimurim* en el tracto digestivo de *C. elegans*

La figura VI.5.4 muestra la evolución de la carga microbiana de *Salmonella* en el intestino de *C. elegans* infectado con dicho microorganismo.

Como se puede observar, *Salmonella* creció hasta 1,25 ciclos logarítmicos en el grupo infectado (L-ST) a las 24 horas tras la infección, mientras que para el grupo infectado alimentado con extracto de coliflor (L-ST-CL) el recuento de *Salmonella* aumentó sólo aproximadamente 0,5 ciclos logarítmicos, observándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los recuentos de *Salmonella* entre ambas poblaciones para el mismo periodo de tiempo. Esto significa que tras la infección, el microorganismo siguió colonizando el intestino del nematodo independientemente del grupo considerado, pero que el extracto de coliflor ejerció cierto control sobre el crecimiento de *Salmonella*, y por consiguiente, sobre la colonización del intestino. El crecimiento de *Salmonella* disminuyó ligeramente a las 48 horas después de la infección y permaneció estable hasta las 96 horas post-infección en los gusanos no alimentados con el extracto de coliflor, probablemente como consecuencia de la reacción defensiva de *C. elegans*. Cuando los gusanos infectados con *Salmonella* se alimentaron con extracto de coliflor, no solo se observó que la colonización del intestino cesó, sino que se produjo muerte de *Salmonella* a las 48 horas (reducción de 1,5 ciclos logarítmicos) y 96 horas (reducción de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos). Estos niveles de *Salmonella* fueron significativamente más bajos ( $p \leq 0,05$ ) que los observados en los nematodos infectados pero no alimentados con extracto de coliflor (Figura VI.5.4). De acuerdo a estos resultados, es posible afirmar que, la presencia del extracto acuoso de coliflor en agar NGM controla la infección y colonización del tracto digestivo de *C. elegans*

producida por *Salmonella* Typhimurium.



**Figura VI.5.4.** Evolución de la carga microbiana de *Salmonella* en el intestino de *C. elegans* a las 24, 48 y 96 horas post-infección alimentados con extracto de coliflor (barras con puntos) y sin extracto de coliflor (barras blancas). Las barras de error representan la desviación estándar asociada a cada promedio. ANOVA y test post-hoc ( $p \leq 0,05$ ).

Los resultados del presente estudio indicaron que *Salmonella* puede infectar y colonizar el intestino de *C. elegans*. Aballay et al. (2000) estudiaron la presencia de *S. Typhimurium* y *E. coli* en el intestino de *C. elegans* durante un periodo de 5 días. En el día 1, las células de *Salmonella* localizadas en el intestino crecieron alrededor de 1,5 ciclos logarítmicos. Los recuentos de bacteria patógena casi se duplicaron en el segundo día, y parecieron estabilizarse en el tercer día, cuando se alcanzaron 3,5 ciclos logarítmicos. En comparación con estos resultados, en el presente trabajo, los gusanos infectados mostraron un incremento de alrededor de 1,25 ciclos logarítmicos en las células de *Salmonella* en el día 1; sin embargo, no se observó la tendencia ascendente indicada por Aballay et al. (2000) a partir de las 48 horas

post-infección, por el contrario, las células de *Salmonella* disminuyeron alrededor de 1 ciclo logarítmico a las 48 horas después de la infección, con un incremento no significativo a los 4 días (96 horas post-infección). Es posible que la cepa de microorganismo o incluso de *C. elegans* usadas en ambos estudios influyan en el comportamiento del microorganismo a lo largo del tiempo una vez que ha infectado a *C. elegans*. Recientemente, Marsh et al. (2011) observaron recuentos de aproximadamente  $10^4$  UFC/gusano de la cepa L1019 de *S. Typhimurium* (una cepa derivada de SL1344 que expresa proteína verde fluorescente (GFP)) en *C. elegans* en el día 1 post-infección. Este dato está en consonancia con la media del recuento de *S. Typhimurium* ( $2,97 \times 10^4$  UFC/gusano) encontradas en el presente estudio. En este estudio y en el llevado a cabo por Marsh et al. (2011) se observa la misma tendencia a lo largo del tiempo, una concentración similar de células de *Salmonella* de alrededor de  $10^3$ - $10^4$  UFC/gusano en el día 4.

### VI.5.3. Conclusiones

En el presente trabajo se observó una reducción de la supervivencia de *C. elegans* infectado con *Salmonella* (ST) respecto a la población alimentada sólo con *E. coli* OP50 (EC). Sin embargo, cuando los nematodos infectados se alimentaron con extracto de coliflor, la supervivencia de *C. elegans* mejoró considerablemente, superando en días de vida al tratamiento control (EC) hasta el día 16 de estudio.

En este capítulo se pone de manifiesto la capacidad del extracto acuoso de coliflor como antimicrobiano en el intestino de un animal vivo. Este extracto no solo es capaz de frenar la colonización, sino que también produce la muerte de *Salmonella*, es decir, tiene un efecto bactericida a nivel intestinal. Este resultado

abre las puertas para el uso de estos extractos en diversas actividades industriales de interés en alimentación humana y animal.

Los resultados también apoyan el interés por los residuos agroindustriales para obtener los extractos vegetales contribuyendo al desarrollo de la agricultura sostenible, así como a una posible revalorización económica de dichos residuos.

Una vez más se pone de manifiesto la utilidad de *C. elegans* como organismo vivo para estudiar la infección y el posible efecto beneficioso de antimicrobianos naturales.









## *DISCUSIÓN*

---



## VII. DISCUSIÓN GENERAL

Como se expresa en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, desde el punto de vista de la cadena alimentaria, el desafío en las próximas décadas será la incorporación de nuevas alternativas de producción más sostenibles manteniendo altos estándares de inocuidad y garantizando la disponibilidad de alimentos nutritivos, sabrosos y de fácil preparación. En este sentido, se está potenciando el uso de las algas, los insectos o los residuos de la industria agroalimentaria como fuente de alimentos o sustancias con capacidad bioactiva, por ejemplo antimicrobiana. En la presente tesis doctoral se llevan a cabo una serie de estudios en los que se evalúa la capacidad antimicrobiana de determinados compuestos naturales, como la espirulina o un extracto acuoso de coliflor y el quitosano de insecto y crustáceo, obtenidos estos últimos a partir de los residuos de la producción y comercialización de insectos, crustáceos o residuos de coliflor tras su recolección en el campo. Se ha apostado por hacer estudios *in vivo* mediante el uso de *Caenorhabditis elegans*. Los resultados de los trabajos llevados a cabo han mostrado que, tanto los extractos de coliflor y de espirulina, tienen un efecto beneficioso en la supervivencia de las poblaciones de nematodos en las que se han ensayado, lo que los hace valiosos bajo el punto de vista nutricional por el impacto positivo que puedan tener en la salud de los consumidores. Los efectos beneficiosos sobre la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* al consumir de compuestos naturales se han puesto de manifiesto en otros trabajos con extractos vegetales (Rangsinth et al., 2019; Wang, H. et al., 2018; Wang, J. et al., 2020). También se ha visto que hay un efecto del extracto de coliflor sobre la puesta de huevos, sin embargo, no se ha observado un efecto relevante en otros trabajos como el llevado a cabo por Wang, J. et al., (2020) en el que los nematodos fueron alimentados con distintas concentraciones de extracto de naranja. Es posible que en el caso del extracto

de coliflor, algunos polifenoles presentes en este vegetal (catequina, quercetina y rutina), tengan que ver con el efecto sobre la fisiología del nematodo. Saul et al., (2009) observaron aumentos en la esperanza de vida de los nematodos alimentados con catequina, mientras que Arroyo-López (2020) observaron que la alimentación con quercetina y rutina sintéticas aumentaron la puesta de huevos de *C. elegans*.

En lo que se refiere a la espirulina, se ha observado que pigmentos como la ficocianina y ficoeritrina aislados de cianobacterias produjeron un aumento en la esperanza de vida de *C. elegans* así como en la supervivencia del mismo, atenuando otros efectos propios de la senescencia como el deterioro de la funcionalidad del bombeo faríngeo y la movilidad (N. Singh et al., 2015; Sonani, Singh, Awasthi, et al., 2014). Las propiedades antioxidantes de la ficoeritrina (Sonani, Singh, Kumar, et al., 2014) y la ficocianina (N. Singh et al., 2015) podrían estar contribuyendo a controlar o reducir mecanismos o factores relacionados con el envejecimiento en el nematodo, como por ejemplo especies reactivas de oxígeno.

El resultado de las investigaciones llevadas a cabo en esta tesis pone en relieve un hecho importante, y es que el quitosano, considerado una sustancia GRAS, afectó a la supervivencia de *C. elegans* de forma negativa, es decir, la supervivencia empeoró en su presencia a la concentración considerada bacteriostática o bactericida. Este efecto sobre la supervivencia del nematodo se ha descrito anteriormente en trabajos donde se expuso a *C. elegans* a micropartículas de quitosano (Ma, Garrido-Maestu, Lee, et al., 2017). El quitosano, se ha empleado como nematicida, tal como ha sido descrito por Asif et al., (2017) y MAM et al., (2019). La literatura científica siempre ha considerado al quitosano como un producto inocuo a las concentraciones

habituales de uso. Probablemente pueda haber una relación entre la concentración de quitosano y el peso del ser vivo que lo consume. En este caso en concreto, podría ocurrir que la concentración usada, que tiene capacidad antimicrobiana, sea demasiado alta considerando el peso del nematodo, y que como se ha comentado con anterioridad, tenga un efecto nematocida.

La búsqueda de antimicrobianos naturales ha llevado, tanto a la industria como a los investigadores, a probar distintos compuestos procedentes de plantas o animales.

El interés del quitosano como aditivo antimicrobiano en la industria alimentaria está incrementando paulatinamente. En consecuencia, se consideró de indudable interés comparar el efecto antimicrobiano del quitosano de crustáceo (muy común en tecnología de alimentos) y el quitosano de insecto dado el auge que está tomando el uso de insectos en alimentación por el menor impacto de su producción en el medio ambiente y teniendo en cuenta la nueva reglamentación de la UE que los incluye definitivamente como “Novel Foods”.

En los estudios llevados a cabo en la presente tesis se han observado diferencias entre la actividad antimicrobiana de ambos quitosanos. En algunos casos el quitosano de crustáceo pareció tener mayor poder antimicrobiano que el de insecto. Byun et al. (2013) demostraron que incluso dentro del mismo animal, existieron características fisicoquímicas y funcionales distintas entre el quitosano preparado de cáscara de pata de cangrejo molida y entera, entre las que se encuentran, variaciones en el contenido de nitrógeno, o en el grado de desacetilación, solubilidad y viscosidad, aspectos importantes para definir su capacidad antimicrobiana. Es lógico pensar que estas diferencias en las características fisicoquímicas y funcionales pueden ser mayores cuando el



quitosano procede de especies distintas. Por tanto, diferencias entre algunos de los factores que influyen en la actividad antimicrobiana del quitosano quizás justificarían de alguna forma la diferencia observada en nuestros resultados entre el quitosano de insecto y crustáceo (Wenling et al. 2005).

A pesar de las diferencias observadas en algunos ensayos, el quitosano de insecto presentó buenas propiedades antimicrobianas que mejoraron cuando se combinó con las altas presiones hidrostáticas. En concreto, en la presente tesis se ha demostrado que con un tratamiento de presión de intensidad mucho menor a los dados en la industria alimentaria de 450 MPa (2 min.), el quitosano de insecto tiene mayor capacidad antimicrobiana que el quitosano de crustáceo. Mientras que el quitosano de crustáceo muestra un efecto bacteriostático, el quitosano de insecto es totalmente bactericida. Esta es una muestra también de las diferencias que pueden surgir como consecuencia del origen del quitosano y puede afianzar el uso del quitosano de insecto en aplicaciones donde se requiera un efecto conjunto con otras tecnologías, en este caso altas presiones hidrostáticas.

En la industria agroalimentaria es importante considerar el impacto que pueden tener las sustancias derivadas de otras fuentes alternativas sobre determinados microorganismos patógenos, concretamente *Salmonella enterica* var. Typhimurium, cuando están infectando a un ser vivo. Este aspecto puede ser especialmente relevante en la industria avícola o porcina.

En el caso del extracto de espirulina, no se observó una mejora en la supervivencia del nematodo infectado con *Salmonella*, a pesar de que sí se había detectado un efecto beneficioso en la supervivencia de la población no infectada. Sin embargo, cuando se midió la concentración de *Salmonella* en el

---

interior del intestino del nematodo sí se observó una disminución importante en la carga de *Salmonella* en la población infectada y alimentada con extracto de espirulina respecto al recuento inicial de dicho microorganismo. Por tanto, el extracto de espirulina parece reducir la colonización intestinal por *S. Typhimurium* en el nematodo. Una posible explicación a la reducción de la carga microbiana patógena podría estar vinculada con un incremento de la respuesta inmunológica, lo cual se ha publicado ya con otros invertebrados infectados con otros microorganismos y tratados con extractos acuosos de *Spirulina* (Tayag et al., 2010), siendo así factible una estimulación del sistema inmunológico del nematodo para eliminar *Salmonella*, aunque no lo suficiente como para que se refleje en la supervivencia.

Estos resultados parecen avalar la posible aplicación industrial de la espirulina en determinados campos de la alimentación humana y animal, teniendo en cuenta que otros estudios *in vivo* confirman la utilidad antimicrobiana de extractos de espirulina para tratar infecciones (Shanmugapriya, Saravana Babu, Hariharan, Sivanesarwan, & Anusha, 2015; Sugiharto et al., 2018; Yusuf et al., 2016).

En el caso del extracto de coliflor, éste produjo el efecto esperado, es decir, la supervivencia del nematodo infectado fue mayor que la que tenía cuando no se alimentó con extracto de coliflor, aunque no alcanzó los niveles del nematodo no infectado. Estos resultados se refuerzan con los hallazgos encontrados en otros estudios en cuanto a la mayor supervivencia de *C. elegans* infectados con bacterias Gram positivas y Gram negativas y tratados con extractos acuosos de plantas o polifenoles vegetales (Kim et al., 2015; C. Kong et al., 2014).

Como en el caso de la espirulina, se estudió la evolución de la carga microbiana de *Salmonella* en el intestino de *C. elegans*. La carga microbiana de la población alimentada con el extracto disminuye, consiguiendo un efecto bactericida respecto a la concentración inicial de *Salmonella*.

Estos resultados, abren la puerta a la utilización de estos extractos de espirulina y de residuos de la coliflor en alimentación animal, dando lugar a una aplicación industrial de estos hallazgos. El hecho de poder reducir la carga de este microorganismo zoonótico en el intestino de pollos o cerdos permitiría una menor dispersión a lo largo de la cadena alimentaria y debería tener un impacto positivo en la inocuidad de las materias primas cárnicas.





## ***CONCLUSIONES***

---



## VIII. CONCLUSIONES

Las conclusiones finales que se extraen del trabajo de esta tesis son:

1. Ambos quitosanos, de crustáceo y de insecto, muestran actividad antimicrobiana *in vitro*. En el caso de *Salmonella*, el quitosano de crustáceo presenta, en general, mayor capacidad antimicrobiana que el de insecto.
2. El tamaño del inóculo y el valor de pH tienen un efecto sobre la capacidad antimicrobiana de los quitosanos de insecto y crustáceo, aunque dicho efecto depende fundamentalmente del tipo de microorganismo y de la procedencia del quitosano.
3. El efecto del tratamiento de HPP en combinación con quitosano depende de la intensidad de tratamiento. A presiones de 300 MPa, la combinación tiene efecto bacteriostático, impidiendo el crecimiento de *S. Typhimurium* durante todo el tiempo de estudio, mientras que cuando se incrementa la presión a 450 MPa, la combinación de tratamientos tiene un efecto sinérgico y bactericida, inactivando hasta 7 ciclos logarítmicos de *S. Typhimurium*.
4. La combinación HPP y quitosano de insecto, en general, es más efectiva que la combinación HPP y quitosano de crustáceo.
5. La combinación de tratamiento HPP y quitosano produce un daño subletal en las células de *S. Typhimurium*. Sin embargo, en el caso del tratamiento de quitosano de insecto a 450 MPa dicho daño no supone un problema bajo el punto de vista de un posible riesgo emergente ya que las células dañadas no son capaces de reparar el daño y finalmente mueren.



6. Las distintas sustancias naturales estudiadas afectan en diferente medida a la supervivencia de *C. elegans* sin infectar. La exposición a extractos de subproductos de coliflor al 3% y de espirulina al 0,1% incrementa de manera significativa la supervivencia de los nematodos. Por el contrario, dicha supervivencia se ve comprometida en presencia de quitosano de crustáceo e insecto al 0,15%.

7. Los nematodos infectados alimentados con extracto de espirulina no mejoran su supervivencia respecto a la población control; por el contrario, la presencia de extracto de coliflor sí que la mejora de manera significativa.

8. Los estudios de lisis del intestino de *C. elegans* llevados a cabo para determinar el efecto antimicrobiano *in vivo* demuestran que, tras 48 horas de incubación en presencia de los extractos de coliflor y espirulina, éstos son capaces de frenar la colonización y de producir la muerte de *Salmonella*, es decir, tienen un efecto bactericida a nivel intestinal.

9. *C. elegans* ha demostrado ser un buen modelo para estudiar la infección por patógenos alimentarios y los efectos beneficiosos de determinadas sustancias naturales.

10. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral ponen de manifiesto que la combinación de un tratamiento suave de HHP (450 MPa, 2 min) en presencia de una solución de quitosano de insecto (0,15%) se postula como una buena alternativa para la conservación de alimentos mínimamente procesados.

11. Del mismo modo, la capacidad antimicrobiana de determinadas sustancias naturales procedentes de fuentes alternativas más sostenibles, se ha revelado como una medida de control adicional, que abre la puerta a su

aplicación como ingredientes en alimentación animal al reducir la infección intestinal *in vivo*.







# ***BIBLIOGRAFÍA***

---



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aballay, A., Yorgey, P., y Ausubel, F. M. (2000). *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 10(23), 1539-1542. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00830-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00830-7)
- Aboulfadl, M. (2012). Nutritional and chemical evaluation of white cauliflower by-products flour and the effect of its addition on beef sausage quality. *Journal of Applied Sciences Research*, 8, 693-704.
- Abdo, S., Hetta, M., Samhan, F., Salah El Din, R., y Ali, G. (2012). Phytochemical and Antibacterial Study of Five Freshwater Algal Species. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11, 109–116. <https://doi.org/10.3923/ajps.2012.109.116>
- Acha, P. N., y Szyfres, B. (2001). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.: Vol. I.*
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (2018). *Revista del Comité Científico de la AECOSAN nº27*. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas\\_comite\\_cientifico/comite\\_cientifico\\_27.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/revistas_comite_cientifico/comite_cientifico_27.pdf)
- Alghazeer, R., Whida, F., Abduelrhman, E., Gammoudi, F., y Naili, M. (2013). *In vitro* antibacterial activity of alkaloid extracts from green, red and brown macroalgae from western coast of Libya. *African Journal of Biotechnology*, 12, 7086-7091.
- Allan, G. G., Altman, L. C., Bensinger, R. E., Ghosh, D. K., Hirabayshi, Y., y Neogi, S. (1984). Biomedical application of chitin and chitosan. En *Chitin, chitosan and related enzymes*. (Vol. 1, pp. 119-133). Academic Press, Inc.



- Al-Ghanayem, A. (2017). Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* extracts against certain pathogenic bacteria and fungi. *Advances in BioResearch*, 8, 96–101. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.8.6.96101>
- Al-Saif, S. S. A., Abdel-Raouf, N., El-Wazanani, H. A., y Aref, I. A. (2014). Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(1), 57-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.06.001>
- Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2009). *Introduction*. WormAtlas. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
- Anand, S. P., y Sati, N. (2013). Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives.
- Arroyo-López, C. (2020). *Caenorhabditis elegans*: a model to study the an-thelmintic effects of polyphenolic compounds on the fertility of para-sitic gastrointestinal nematodes?bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.289637>
- Arshad, M. S., y Batool, S. A. (2017). Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety. En *Food Additives* (Desiree Nedra Karunaratne and Geethi Pamunuwa).
- Asif, M., Tariq, M., Faheem Ahmad, Khan, A., Ansari, T., Khan, F., y Siddiqui, A. M. (2017). Potential of chitosan alone and in combination with agricultural wastes against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting eggplant. *Journal of Plant Protection Research*, 57(3), 288–295. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0041>

- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., y Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bajpai, V. K. (2016). Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: Amini review. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 45, 1076-1085.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Berdejo, D., Pagán, E., García-Gonzalo, D., y Pagán, R. (2019). Exploiting the synergism among physical and chemical processes for improving food safety. *Current Opinion in Food Science*, 30, 14–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.08.004>
- Bleoancă, I., Saje, K., Mihalcea, L., Oniciuc, E.-A., Smole-Mozina, S., Nicolau, A. I., y Borda, D. (2016). Contribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese - A hurdle approach. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 7–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.002>
- Bondi, M., Lauková, A., de Niederhausern, S., Messi, P., y Papadopoulou, C. (2017). *Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety*. 2017, 1-3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2017/1090932>
- Borowitzka, M. A. (2018). Chapter 3 - Biology of Microalgae. En I. A. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23-72). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012811405600037>

- Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D. G. A. B., y Hendriks, W. (2014). Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of nutritional science*, 3, e29. <https://doi.org/10.1017/jns.2014.23>
- Bouarab-Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., y Oulahal, N. (2018). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9357>
- Bover i Cid, S., y Garriga i Turón, M. (2014). *Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeriamonocytogenes en alimentos listos para el consumo*. (N.º 5). [http://acsa.gencat.cat/web/.content/\\_Publicacions/Informes-tecnics/Informes\\_ACSA/informe\\_listeria\\_irta\\_2014\\_castella.pdf](http://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-tecnics/Informes_ACSA/informe_listeria_irta_2014_castella.pdf)
- Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, G., De Santi, M., y Sisti, M. (2006). Activity of *Brassica oleracea* Leaf Juice on Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection*, 69, 2274-2279. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2274>
- Bretado Aragón, L., Jiménez Mejía, R., López-Meza, J., y Loeza-Lara, P. (2018). Composites of silver-chitosan nanoparticles: a potential source for new antimicrobial therapies. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 47, 7-25.
- Brito, A., Silva, A., Oliveira, C., Souza, A., Ferreira, P., Souza, I., Araujo, L., da Silva, G., Sampaio, R., Tavares, R., Pereira, R., Miranda Neto, M., y Silva, B. (2020). *Spirulina platensis* prevents oxidative stress and inflammation promoted by strength training in rats: dose-response relation study. *Scientific Reports*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63272-5>
- Brust, M., y Fraenkel, G. (1955). *The nutritional requirements of the larvae of a blowfly, Phormia regina (Meig.)*. 28(3), 186-204.
- Busvine, J. R. (1965). Wire mesh for the exclusion of houseflies. 63, 305-309.

- Byerly, L., Cassada, R. C., y Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology*, 51(1), 23-33. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Byun, S. M., No, H. K., Hong, J.-H., Lee, S. I., y Prinyawiwatkul, W. (2013). Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(1), 136–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03169.x>
- Cai, J., Yang, J., Du, Y., Fan, L., Qiu, Y., Li, J., y Kennedy, J. F. (2006). Enzymatic preparation of chitosan from the waste *Aspergillus niger* mycelium of citric acid production plant. *Carbohydrate Polymers*, 64(2), 151-157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.11.004>
- Caliceti, C., Capriotti, A., Calabria, D., Bonvicini, F., Zenezini Chiozzi, R., Montone, C., Piovesana, S., Zangheri, M., Mirasoli, M., Simoni, P., Laganà, A., y Roda, A. (2019). Peptides from Cauliflower By-Products, Obtained by an Efficient, Ecosustainable, and Semi-Industrial Method, Exert Protective Effects on Endothelial Function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/1046504>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2019). *Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000443*. <https://wayback.archive-it.org/7993/20171031005742/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm347791.htm>
- Cercenado, E., y Saavedra, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Anales de Pediatría Continuada*, 7, 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)

- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., y Guha, A. K. (2008). Enhancement of growth and chitosan production by *Rhizopus oryzae* in whey medium by plant growth hormones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 120-126.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.006>
- Chaudhuri, A., y Chaudhuri, M. (2018). Why are gram-negative bacteria resistant to antibiotics? The Biochemists. <https://medium.com/the-biochemists/why-are-gram-negative-bacteria-resistant-to-antibiotics-c732fe9afd06>
- Chen, C.-Y., y Chung, Y.-C. (2012). Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 620-627.
- Cho, Y. I., No, H. K., y Meyers, S. P. (1998). *Physicochemical Characteristics and Functional Properties of various Commercial Chitin and Chitosan Products*. 46(9), 3839-3843.
- Choi, J.-G., Kang, O.-H., Lee, Y.-S., Chae, H.-S., Oh, Y.-C., Brice, O.-O., Kim, M.-S., Sohn, D.-H., Kim, H.-S., Park, H., Shin, D.-W., Rho, J.-R., y Kwon, D.-Y. (2011). *In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract against Salmonella*. 2011(690518). <https://doi.org/10.1093/ecam/nep105>
- Chouhan, S., Sharma, K., y Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Chu, W.-L., y Phang, S.-M. (2019). Microalgae and Cyanobacteria as a Potential Source of Anticancer Compounds. En *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals : Volume I Food, Health and Nutraceu-tical Applications.*: Vol. I (p. 300). CRC Press.

- Comisión Europea y Servicio de BIO Inteligencia. (2010). Preparatory study on food waste across EU 27. [https://ec.europa.eu/environment/eussd/pdf/bio\\_foodwaste\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/environment/eussd/pdf/bio_foodwaste_report.pdf)
- Contento Salcedo, A. M. (1996). *Nuevos métodos fotométricos y cromatográficos para la determinación de colorantes rojos en alimentos*. [PhD Thesis]. Universidad de Castilla-La Mancha.
- Corsi, A. K., Wightman, B., y Chalfie, M. (2015). *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans*. The wormbook. The online review of *C. elegans* biology. <http://www.wormbook.org/>
- Cram, E. J. (2015). Mechanotransduction: Feeling the Squeeze in the *C. elegans* Reproductive System. *Current Biology*, 25(2), R74–R75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.007>
- David, O., Alese, M., Komolafe, D. M., Adejare, I. J., Alese, O., y Omonisi, A. (2016). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of partially purified enterocin produced by *Enterococcus faecalis* and its application in wound healing. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 18, 1. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v18i1.1>
- Davidson, P. M., Critzer, F. J., y Taylor, T. M. (2013). Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 163-190. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182535>
- De la Fuente-Salcido, N. M., Villarreal-Prieto, J. M., Díaz León, M. Á., y García Pérez, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas\copyrightuticas*, 46, 7–16.
- Demule, M. C. Z., Decaire, G. Z., y Decano, M. S. (1996). *Bioactive substances from Spirulina platensis (Cyanobacteria)*. 58, 93-96.
- De Oliveira, E. F., Nguyen, C. H., Stepanian, K., Cossu, A., y Nitin, N. (2019). Enhanced bacterial inactivation in apple juice by synergistic

- interactions between phenolic acids and mild food processing technologies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 56, 102186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102186>
- Dinh, J., Angeloni, J. T., Pederson, D. B., Wang, X., Cao, M., y Dong, Y. (2014). Cranberry Extract Standardized for Proanthocyanidins Promotes the Immune Response of *Caenorhabditis elegans* to *Vibrio cholerae* through the p38 MAPK Pathway and HSF-1. *PLOS ONE*, 9(7), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103290>
- Dorman, H. J. D., y Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Dreger, M., y Wielgus, K. (2013). Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. *Herba Polonica*, 59(4). <https://content.sciendo.com/view/journals/hepo/59/4/article-p142.xml>
- Duran, B., González-Manzano, S., Sánchez, I., Moreno-Arribas, M. V., Bartolomé, B., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Santos-Buelga, C., y González-Paramás, A. M. (2019). Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*, 8, 75. <https://doi.org/10.3390/foods8020075>
- EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K. I., Kearney, J., Mac-iuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H. J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., ... Knutsen, H. K. (2021). Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 19(1), e06343. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>

- El-Baz, F., El-Senousy, W. M., El-Sayed, A. B., y Kamel, M. (2013). *In vitro* antiviral and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3, 52-56. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.31209>
- El-Sheekh, M., Daboor, S., Swelim, M., y Mohammed, S. (2014). Production and characterization of antimicrobial active substance from *Spirulina platensis*. *Iranian journal of microbiology*, 6.
- Erdem, B., Kariptaş, E., Kaya, T., Tulumoglu, S., y Görgülü, Ö. (2016). Factors influencing antibacterial activity of chitosan against *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 5, 45-48. <https://doi.org/10.3329/icpj.v5i5.27316>
- Eriksen, N. (2008). Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>
- European Commission (EC). (2014). Review report for the basic substance Chitosan Hydrochloride Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 20 March 2014 in view of the approval of Chitosan Hydrochloride as basic substance in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 (SANCO/12388/2013- rev. 2).
- European Commission (EC). (2017). Commission regulation (EU) 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein. (L 138; pp. 92-116).
- European Food Safety Authority (EFSA). (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents



- and food-borne outbreaks in 2016.  
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634>
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Ewbank, J., y Zugasti, O. (2011). *C. elegans*: Model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Disease Models & Mechanisms*, 4, 300–304.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.006684>
- Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewedi, F. M., y El-Baroty, G. S. A. (1989). Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *Journal of Food Protection*, 52(9), 665-667.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.9.665>
- Félix, M.-A., y Braendle, C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(22), R965-R969.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>
- Fernandes, J., Tavaría, F., Soares, J., Ramos, O., Monteiro, M., Pintado, M., y Malcata, F. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*, 25, 922–928.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.003>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2011). Global food losses and food waste. <http://www.fao.org>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). Production quantities of cauliflowers and broccoli by country 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Fouladkhah, A., Bisha, B., Kabir, M. N., Chowdhury, S., Aras, S., y Allison, A. (2019). Advances in Prevention of Foodborne Pathogens of Public Health Concern during Manufacturing.

- Ganan, M., Carrascosa, A. V., y Martínez-Rodríguez, A. J. (2009). Antimicrobial Activity of Chitosan against *Campylobacter* spp. and Other Microorganisms and Its Mechanism of Action. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1735-1738. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1735>
- Genene, T., Hailu, D., y Tsegaye, Z. (2016). Importance of *Arthrospira* [*Spirulina*] in Sustainable Development. 2016, 60-68.
- Gilbert, P., Evans, D. J., Evans, E., Duguid, I. G., y Brown, M. R. W. (1991). Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04665.x>
- Gochev, V., Dobрева, A., Girova, T., y Stoyanova, A. (2010). Antimicrobial Activity of Essential Oil from Rosa Alba. *Biotechnology y Biotechnological Equipment*, 24(sup1),512-515. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817892>
- Goldberg, G. (2003). Plants: diet and health. The report of a British nutrition foundation task force. (p. 347).
- Gortari, M. C., y Hours, R. A. (2013). Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 14-14.
- Gottardi, D., Bukvicki, D., Prasad, S., y Tyagi, A. K. (2016). Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1394. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01394>
- Goy, R. C., y Assis, O. B. G. (2014). Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 643-648.
- Goy, R. C., Britto, D. de, y Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19, 241-247.
- Griffin, S. G., Wyllie, S. G., Markham, J. L., y Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining

- their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 322-332. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199909/10\)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199909/10)14:5<322::AID-FFJ837>3.0.CO;2-4)
- Grimont, P., y Weill, F.-X. (2007). Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 1-167.
- Gücükoğlu, A., Yildirim, Y., Terzi, G., Erdem, M., y Sireli, U. T. (2016). *In vitro* effects of chitosan on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Veterinary medicine*, 13, 11-18.
- Guha, S., Cao, M., Kane, R., Savino, A., Zou, S., y Dong, Y. (2012). The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by daf-16 and osr-1. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9459-x>
- Günlü, A., Sipahioğlu, S., y Alpas, H. (2014). The effect of chitosan-based edible film and high hydrostatic pressure process on the microbiological and chemical quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) filets during cold storage (4±1°C). *High Pressure Research*, 34(1), 110–121. <https://doi.org/10.1080/08957959.2013.836643>
- Guzmán, F., Wong, G., Román, T., Cárdenas, C., Álvarez, C., Schmitt, P., Albericio, F., y Rojas, V. (2019). Identification of Antimicrobial Peptides from the Microalgae *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher and Bactericidal Activity Improvement. *Marine Drugs*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/md17080453>
- Hamouda, I., y Doumandji, A. (2017). Comparative phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis* and the green alga *Chlorella pyrenoidosa*: Potential application of bioactive components as an alternative to infectious diseases. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Section Sciences de la*

- Terre, 39, 41-49.
- Hodgkin, J. (1988). Sexual dimorphism and sex determination. En *The nematode C. elegans* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 243-279). Cold Spring Harbor.
- Holden-Dye, L., y Walker, R. J. (2014). *Anthelmintic drugs and nematicides: studies in Caenorhabditis elegans*. <http://www.wormbook.org>
- Honarkar, H., y Barikani, M. (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly Volume*, 140(1403).
- Hu, Z. (2018). Challenges and opportunities related to the use of chitosan as food preservative. *Journal of Applied Microbiology*, 126. <https://doi.org/10.1111/jam.14131>
- Hu, Z., y Gänzle, M. G. (2019). Challenges and opportunities related to the use of chitosan as a food preservative. *Journal of Applied Microbiology*, 126(5), 1318-1331. <https://doi.org/10.1111/jam.14131>
- Huang, H.-W., Hsu, C.-P., y Wang, C.-Y. (2020). Healthy expectations of high hydrostatic pressure treatment in food processing industry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.10.002>
- Hudson, J. A. (1992). Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 14(4), 178-180. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1992.tb00678.x>
- Huis, A., y Oonincx, D. G. A. B. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>
- Ifuku, S., y Saimoto, H. (2012). Chitin Nanofibers: Preparations, Modifications, and Applications. *Nanoscale*, 4, 3308-3318. <https://doi.org/10.1039/c2nr30383c>

- Jadhav, A., y Diwan, A. (2018). Studies on antimicrobial activity and physico-chemical properties of the chitin and chitosan isolated from shrimp shell waste. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 47.
- Jakobsen, H., Bojer, M. S., Marinus, M. G., Xu, T., Struve, C., Kroghfelt, K. A., y Løbner-Olesen, A. (2013). The Alkaloid Compound Harmane Increases the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* during Bacterial Infection, by Modulating the Nematode's Innate Immune Response. *PLOS ONE*, 8(3), 1-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060519>
- Jia, Z., Shen, D., y Xu, W. (2001). Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Research*, 333(1), 1-6. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00112-4)
- Jovanović, G., Klaus, A., y Niksic, M. (2016). Antimicrobial activity of chitosan coatings and films against *Listeria monocytogenes* on black radish. *Revista Argentina de Microbiología*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.02.003>
- Jumaa, M., Furkert, F. H., y Müller, B. W. (2002). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53(1), 115-123. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00191-6](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00191-6)
- Karadeniz, P., y Ercan, I. (2017). Examining tests for comparing survival curves with right censored data. *Statistics in Transition. New Series*, 18, 311-328. <https://doi.org/10.21307/stattrans-2016-072>
- Karali, F. (2011). *Arthrospira platensis*. [http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/fedor\\_kara/index.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/fedor_kara/index.htm)
- Kim, H.-I., Kim, J.-A., Choi, E.-J., Harris, J. B., Jeong, S.-Y., Son, S.-J., Kim, Y., y Shin, O. S. (2015). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial efficacy of natural plant-derived compounds against *Vibrio cholerae* of O1 El Tor Inaba serotype. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(3), 475-483.

- <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.991685>
- Kong, C., Eng, S.-A., Lim, M.-P., y Nathan, S. (2016). Beyond Traditional Antimicrobials: A *Caenorhabditis elegans* Model for Discovery of Novel Anti-infectives. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01956>
- Kong, C., Yehye, W., Abd. Rahman, N., Tan, M.-W., y Nathan, S. (2014). Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-4>
- Kong, M., Chen, X.-G., Liu, C.-S., Liu, C.-G., Meng, X. H., y Yu, L.-J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 65, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.003>
- Kong, M., Chen, X.-G., Xue, Y.-P., Liu, C.-S., Yu, L.-J., Ji, Q.-X., Cha, D. S., y Park, H. J. (2008). Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. *Frontiers of Materials Science in China*, 2, 214-220. <https://doi.org/10.1007/s11706-008-0036-2>
- Kulandaivel, S., Prakash, R., Anitha, R., y Arunnagendran, N. (2007). Antibacterial activity of *Spirulina platensis* and *Oscillatoria* sp. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 1, 127-129.
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)
- Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., Zivanovic, S., Davidson, P., y Harte, F. (2009). Inactivation of Escherichia coli K-12 in Apple Juice Using Combination of High-Pressure Homogenization and Chitosan. *Journal of Food Science*, 74, M8-M14. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00974.x>

- Kumari, S., y Rath, P. K. (2014). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (*Labeo rohita*) Fish Scales. *Procedia Materials Science*, 6, 482-489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.062>
- Kumirska, J., Weinhold, M., Thöming, J., y Stepnowski, P. (2011). Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials— Influence of Physico-chemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation. *Polymers*, 3. <https://doi.org/10.3390/polym3041875>
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Léopold Kurz, C., y Ewbank, J. J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Current Biology*, 10(23), 1543-1545. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00833-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00833-2)
- Layam, A., Kalpana, P., y Sai Bramari, G. (2016). Evaluation of *Spirulina platensis* as microbial inoculants to enhanced protein levels in *Amaranthus gangeticus*. *African Journal of Agricultural Research*, 11, 1353-1360. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7953>
- Lee, B.-C., Kim, M., Choi, S.-H., Kim, K., y Kim, T. (2009). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of water-soluble chitosan oligosaccharides against *Vibrio vulnificus*. *International Journal of Molecular Medicine*, 24, 327–333. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000236](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000236)
- Lee, N. K., y Paik, H. D. (2016). Status, Antimicrobial Mechanism, and Regulation of Natural Preservatives in Livestock Food Systems. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 547-557. <https://doi.org/https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.547>
- Liu, N., Chen, X.-G., Park, H.-J., Liu, C.-G., Liu, C., Meng, X., y Yu, L.-J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. *Carbohydrate Polymers*, 64, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.028>
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., y Jeong, K. C. (2017). Application, mode of ac-

- tion, and *in vivo* activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate Polymers*, 176, 257-265.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A., Lee, C., Chon, J., Jeong, D., Yue, Y., Sung, K., Park, Y., y Jeong, K. C. (2017). Comprehensive *in vitro* and *in vivo* risk assessments of chitosan microparticles using human epithelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Hazardous Materials*, 341. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.071>
- Mala, R., Sarojini, M., Saravanababu, S., y Umadevi, G. (2009). Screening for antimicrobial activity of crude extracts of *Spirulina platensis*. 9(3), 1951-1955.
- Malinowska-Pańczyk, E., Kołodziejaska, I., Murawska, D., y Wołosewicz, G. (2009). The Combined Effect of Moderate Pressure and Chitosan on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Cells Suspended in a Buffer and on Natural Microflora of Apple Juice and Minced Pork. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 202-209.
- MAM, E.-S., Sandy, E., y Awd-Allah, S. (2019). Nematicidal effect of abamectin, boron, chitosan, hydrogen peroxide and *Bacillus thuringiensis* against citrus nematode on Valencia orange trees. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 3, 111–117.  
<https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001041>
- Marsh, E., Berg, M., y May, R. (2011). A Two-Gene Balance Regulates *Salmonella Typhimurium* Tolerance in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *PloS One*, 6, e16839.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016839>
- Mateo, P., Leganes, F., Perona, E., Loza, V., y Fernandez-Piñas, F. (2015). Cyanobacteria as bioindicators and bioreporters of environmental analysis in aquatic ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 24.



- <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0903-y>.
- Medina-Jaritz, N. B., Pérez-Solis, D., Ruiloba de Leon F., S. L., y Olvera-Ramírez, R. (2012). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts from *Arthrospira maxima*.
- Mendiola, J. A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., y Señoráns, F. J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 102(4), 1357-1367.
- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068> Michalak, I., y Chojnacka, K. (2018). Introduction: Toward algae-based products. En *Algae Biomass: characteristics and applications*. Springer.
- Mohr, K. I., Brinkmann, N., y Friedl, T. (2011). Cyanobacteria. En J. Reitner y V. Thiel (Eds.), *Encyclopedia of Geobiology* (pp. 306-311). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1\\_221](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9212-1_221)
- Moleyar, V., y Narasimham, P. (1986). Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*, 3(4), 331-336. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0740-0020\(86\)90017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0740-0020(86)90017-1)
- Moy, T. I., Ball, A. R., Anklesaria, Z., Casadei, G., Lewis, K., y Ausubel, F. M. (2006). Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), 10414–10419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604055103>
- Muschiol, D., Schroeder, F., y Traunspurger, W. (2009). Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. *BMC Ecology*, 9, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-9-14>
- Muzzarelli, R., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G., y Varaldo, P. (1990). Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(10), 2019-2023. <https://doi.org/10.1128/aac.34.10.2019>

- Nazzaro, F., Fratianni, F., D'Acerno, A., Raffaele, C., Ayala-Zavala, F. J., Gómez da Cruz, A., y De Feo, V. (2019). Essential Oils and Microbial Communication.
- Neugart, S., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Klopsch, R., Wiesner-Reinhold, M., y Schreiner, M. (2018). The intrinsic quality of brassicaceous vegetables: How secondary plant metabolites are affected by genetic, environmental, and agronomic factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 460-478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.038>
- No, H. K., y Meyers, S. P. (1995). Preparation and Characterization of Chitin and Chitosan—A Review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2), 27-52. [https://doi.org/10.1300/J030v04n02\\_03](https://doi.org/10.1300/J030v04n02_03)
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S.-H., y Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 65-72. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6)
- Ochoa Yepes, O., Guz, L., Estevez Areco, S., Candal, R., Goyanes, S., y Famá, L. (2018). Starch nanocomposite films for food packaging. In *Nanotechnology applications in the food industry*. (pp. 107–140). CRC Press.
- Oiye, S. O., y Muroki, N. M. (2002). Use of Spices in Foods. 7(2), 39-44.
- Oktaviani, D., Bae, Y.-S., Meinita, M., Moon, I.-S., y Hong, Y.-K. (2019). An Ethanol Extract of the Brown Seaweed *Hizikia fusiformis* and Its Active Constituent, Fucosterol, Extend the Lifespan of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. 29, 1120. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.10.1120>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019). Food Safety. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Osman, M., Abo-Shady, P. A., y El-Nagar, M. (2015). Cyanobacterial *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) as safener against harmful effects of fusilide

- herbicide on faba bean plant. *Rendiconti Lincei*, 27. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0498-y>
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J.-P., y Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2), 155-162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00070-6)
- Palacios-Gorba, C., Pina, R., Tortajada, M., Jiménez-Belenguer, A., Siguemoto, E., Rodrigo, D., y Pina-Pérez, M. (2020). *Caenorhabditis elegans* as *in vivo* model to assess the fucoidan bioactivity preventing *Helicobacter pylori* infection. *Food & Function*, 11. <https://doi.org/10.1039/D0FO00768D>
- Palaniappan, K., y Holley, R. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 164-168. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., y Bajpai, V. K. (2017). Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2161. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pankar, S., y Bornare, D. (2018). Studies on cauliflower leaves powder and its waste utilization in traditional product. *International Journal Of Agricultural Engineering*, 11, 95-98. <https://doi.org/10.15740/HAS/IJAE/11.Sp.Issue/95-98>
- Pardo, G., Moral, R., Aguilera, E., y del Prado, A. (2015). Gaseous emissions from management of solid waste: a systematic review. *Global Change Biology*, 21(3), 1313-1327. <https://doi.org/10.1111/gcb.12806>
- Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez-López, A., y Rodrigo Aliaga, M. D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against

- pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, 235, 34-44.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.033>
- Pina-Pérez, M. C., Silva-Angulo, A., Muguerza, B., Rodrigo Aliaga, M. D., y Martínez-López, A. (2009). Synergistic Effect of High Hydrostatic Pressure and Natural Antimicrobials on Inactivation Kinetics of *Bacillus cereus* in a Liquid Whole Egg and Skim Milk Mixed Beverage. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 649-656.  
<https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0268>
- Pisoschi, A. M., Cimpeanu, C., y Predoi, G. (2015). Electrochemical Methods for Total Antioxidant Capacity and its Main Contributors Determination: A review. *Open Chemistry*, 13. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0099>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., y Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Pradas Baena, I., y Moreno Rojas, J. M. (2016). Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en la Industria Alimentaria. (pp. 1-18). Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. [www.juntadeandalucia.es/ifapa](http://www.juntadeandalucia.es/ifapa)
- Pratita, A., Fathurohman, M., Ruswanto, R., Khusnul, y Suhartati, R. (2019). Potential of Autotroph Microalgae (*Spirulina plantentis*) as Antimicrobial agent. *Journal of Physics: Conference Series*, 1179, 012173.  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1179/1/012173>
- Qureshi, M. A., Ali, R. A., y Hunter, R. (1995). Immuno-modulatory effects of *Spirulina platensis* supplementation in chickens. *Proceedings of the 44th Western poultry disease conference.*, 117-121.
- Raafat, D. (2004). Evaluation of the effect of chitosan on the activity of some

- antimicrobial agents. [Master Thesis]. University of Alexandria.
- Rabea, E., Badawy, M., Stevens, C., Smagghe, G., y Steurbaut, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Rafika, C., Trabelsi, L., Rym, B. D., Abed, O., Yahia, A., Khemissa, G., Ammar, J., Omran, H., y Ouada, H. (2011). Evaluation of Cytotoxicity and Biological Activities in Extracellular Polysaccharides Released by *Cyanobacterium Arthrospira platensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 831-838. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000400024>
- Ramadan, F., Asker, M., y Ibrahim, Z. K. (2008). Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 211-222. <https://doi.org/10.17221/2567-CJFS>
- Ramadan, M., Hebeish, A., Krupa, I., Montaser, A., Salama, A., y Abelaziz, M. (2015). In vitro and in vivo antibacterial potential of chitosan - g - acrylonitrile silver nanocomposite against a pathogenic bacterium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2.1.
- Ramos, D., Colvara, W., Votto, A., Trindade, G., Silva, P., y Yunes, J. (2015). Antimycobacterial and cytotoxicity activity of microcystins. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21, 9. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0009-8>
- Rangsinth, P., Prasansuklab, A., Duangjan, C., Gu, X., Meemon, K., Wink, M., y Tencomnao, T. (2019). Leaf extract of *Caesalpinia mimosoides* enhances oxidative stress resistance and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2578-5>
- Raven, J. A. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the

- picophytoplankton. *Functional Ecology*, 12(4), 503-513.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Roy, J., Salaiün, F., Giraud, S., Ferri, A., Guan, J., y Chen, G. (2017). Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms.
- Safari, R., Raftani Amiri, Z., y Esmailzadeh Kenari, R. (2019). Antioxidant and antibacterial activities of C-phycoerythrin from common name *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, -.  
<https://doi.org/10.22092/ijfs.2019.118129>
- Sago, S., Board, R., y Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19(2), 175-182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0474>
- Sajid, M., y Azim, K. (2012). Characterization of the Nematicidal Activity of Natural Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60.  
<https://doi.org/10.1021/jf301653n>
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S. L., y García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En *Investigación en plantas de importancia médica* (Rivas-Morales, C., Oranday Cardenas, M.A., y Verde-Star, M.J., pp. 77–100). OmniaScience. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>
- Sanz-Puig, M. (2017). Valorización de subproductos de la industria alimentaria como antimicrobianos naturales frente a microorganismos patógenos mediante tecnologías no térmicas de conservación.
- Sanz-Puig, M., Moreno, P., Pina-Pérez, M. C., Rodrigo Aliaga, M. D., y Martínez-López, A. (2017). Combined effect of high hydrostatic pressure (HPP) and antimicrobial from agro-industrial by-products against *S. Typhimurium*. *LWT*, 77, 126-133.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.031>

- Sanz-Puig, M., Pina-Pérez, M. C., Saenz Gomez, J., Marañón, I., Rodrigo Alia-ga, M. D., y Martínez-López, A. (2015). Effect of polyphenol content on the antimicrobial activity of natural extracts from agroindustrial by- products. 66(1), 4-9.
- Sastry, V. M. V. S., y Rao, G. R. K. (1994). Antibacterial Substances from Marine Algae: Successive Extraction Using Benzene, Chloroform and Methanol. 37, 357-360.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1515/botm.1994.37.4.357>
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Stürzenbaum, S. R., y Steinberg, C. E. W. (2009). Catechin induced longevity in *C. elegans*: From key regulator genes to disposable soma. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(8), 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.05.005>
- Saul, N., Pietsch, K., Stürzenbaum, S. R., Menzel, R., y Steinberg, C. E. W. (2011). Diversity of Polyphenol Action in *Caenorhabditis elegans*: Between Toxicity and Longevity. *Journal of Natural Products*, 74(8), 1713–1720. <https://doi.org/10.1021/np200011a>
- Savard, T., Beaulieu, C., Boucher, I., y Champagne, C. (2002). Antimicrobial Action of Hydrolyzed Chitosan against Spoilage Yeasts and Lactic Acid Bacteria of Fermented Vegetables. *Journal of Food Protection*, 65, 828-833. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.5.828>
- Sem, X., y Rhen, M. (2012). Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* Relies on Disseminated Oxidative Stress in the Infected Host.
- Servicio Andaluz de Salud. Consejería de Salud y Familias. (2019). Informe sobre las tres alertas por *Listeria monocytogenes* declaradas en Andalucía.  
[https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/noticias/19/09/tresal-ertaslisteria130919.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/noticias/19/09/tresalertaslisteria130919.pdf)

- Shanmugapriya, B., Saravana Babu, S., Hariharan, T., Sivaneswaran, S., y Anusha, M. (2015). Dietary administration of *Spirulina platensis* as probiotics on growth performance and histopathology in broiler chicks. 6(2), 2650-2653.
- Shanmugapriya, B., Saravana Babu, S., Hariharan, T., Sivaneswaran, S., Anusha, M., y Udaya Raja, P. (2015). Synergistic effect of *Spirulina platensis* on performance and gut microbial load of broiler chicks. JPS Scientific Publications, 1(2), 149-155.
- Sharma, S. (2015). Food Preservatives and their harmful effects. 5(4).
- Shen, P., Yue, Y., Zheng, J., y Park, Y. (2018). *Caenorhabditis elegans*: A Convenient In Vivo Model for Assessing the Impact of Food Bioactive Compounds on Obesity, Aging, and Alzheimer's Disease. Annual Review of Food Science and Technology, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012709>
- Shirvan, A. R., Shakeri, M., y Bashari, A. (2019). Recent advances in application of chitosan and its derivatives in functional finishing of textiles. En *The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology*. (Woodhead Publishing, pp. 107-133). Shahid-ul-Islam. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081024911000058>
- Silva, A., Genovés Martínez, S., Martorell, P., Zanini, S., Rodrigo, D., y Martínez, A. (2015). Sublethal injury and virulence changes in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* treated with antimicrobials carvacrol and citral. *Food Microbiology*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.016>
- Singh, N., Sonani, R., Awasthi, A., Prasad, B., Patel, A., Kumar, J., y Madamwar, D. (2015). Phycocyanin moderates aging and proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Applied Phycology*.



<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0772-5>

- Singh, R., Shushni, M. A. M., y Belkheir, A. (2015). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(3), 322-328.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.01.019>
- Siva-Kiram, R. R., Madhu, G. M., y Satyanarayana, S. V. (2016). Spirulina in combating Protein Energy Malnutrition (PEM) and Protein Energy Wasting (PEW) - A review. 3(1), 62-79.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3149.0325>
- Sonani, R. R., Singh, N. K., Kumar, J., Thakar, D., y Madamwar, D. (2014). Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*, 49(10), 1757–1766.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.022>
- Sonani, R. R., Singh, N. K., Awasthi, A., Prasad, B., Kumar, J., y Madamwar, D. (2014). Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans*. *Age* (Dordrecht, Netherlands), 36, 9717.  
<https://doi.org/10.1007/s11357-014-9717-1>
- Stiernagle, T. (1999). Freezing and recovery of *C. elegans* stocks. En *C. elegans: A Practical Approach*. (pp. 64-66). Oxford University Press.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*, 11, 1–11.  
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Stoffolano, J., Wong, R., Lo, T., Ford, B., y Geden, C. J. (2020). Effect of chitosan on adult longevity when fed, in no-choice experiments, to *Musca domestica* L., *Tabanus nigrovittatus* Macquart, and *Phormia regina* (Meigen) adults and its consumption in adult *Musca domestica* L. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.5996>

- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., y Petrović, S. (2013). In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3205- 3208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6156>
- Suchland, R., Geisler, W., y Stamm, W. (2003). Methodologies and Cell Lines Used for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 636–642.
- Sugiharto, S., Yudiarti, T., Isroli, I., y Widiastuti, E. (2018). Effect of feeding duration of *Spirulina platensis* on growth performance, haematological parameters, intestinal microbial population and carcass traits of broiler chicks. *South African Journal of Animal Science*, 48, 98-107.
- Surco-Laos, F., Dueñas, M., Gonzalez Manzano, S., Gomez- Orte, E., Cabello, J., Santos-Buelga, C., y Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International*, 46, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.014>
- Tayag, C. M., Lin, Y.-C., Li, C.-C., Liou, C.-H., y Chen, J.-C. (2010). Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5), 764–773. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.023>
- Tharanathan, R. N., y Kittur, F. S. (2003). Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 61-87. <https://doi.org/10.1080/10408690390826455>
- Torres-León, C., Ramírez-Guzman, N., Londoño-Hernandez, L., Martínez-Medina, G. A., Díaz-Herrera, R., Navarro-Macias, V., Alvarez-Pérez,

- O. B., Picazo, B., Villarreal-Vázquez, M., Ascacio-Valdes, J., y Aguilar, C. N. (2018). Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 52.  
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052>
- Tsai, G. J., y Su, W. H. (1999). Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62(3), 239-243.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.3.239>
- Uribe, C., y Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Med.*, 37, 151-158.
- van den Broek, L. A. M., y Boeriu, C. G. (2019). Chitin and Chitosan: Properties and Applications. (Christian V. Stevens). John Wiley & Sons Inc.
- van den Broek, L. A. M., y Boeriu, C. G. (2020). Sources of chitin and chitosan and their isolation. En *Chitin and chitosan: properties and applications*. (John Wiley & Sons, p. 536).
- Vantomme, P., y Halloran, A. (2013). The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment.
- Vilar Junior, J. C., Rubio Ribeaux, D., Alves da Silva, C. A., y De Campos-Takaki, G. M. (2016). Physicochemical and Antibacterial Properties of Chitosan Extracted from Waste Shrimp Shells. 1-7.  
<https://doi.org/10.1155/2016/5127515>
- Voglis, G., y Tavernarakis, N. (2005). Mechanotransduction in the Nematode *Caenorhabditis elegans*.
- Wang, G. H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of food protection*, 55(11), 916—919.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-55.11.916>
- Wang, H., Liu, J., Li, T., y Liu, R. (2018). Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, 9. <https://doi.org/10.1039/C8FO01680A>.

- Wang, J., Deng, N., Wang, T., Li, T., Chen, L., Zheng, B., y Liu, R. (2020). Effects of Orange Extracts on Longevity, Healthspan, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules*, 25, 351. <https://doi.org/10.3390/molecules25020351>
- Wang, X., Du, Y., y Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1), 21-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.007>
- Wenling, C., Duohui, J., Jiamou, L., Gong, Y., Nanming, Z., y Zhang, X. (2005). Effects of the Degree of Deacetylation on the Physicochemical Properties and Schwann Cell Affinity of Chitosan Films. *Journal of Biomaterials Applications*, 20, 157–177. <https://doi.org/10.1177/0885328205049897>
- Wilkins, K. M. y Board, R. G. (1989). Natural antimicrobial systems. In *Mechanisms of Action and Food Preservation Procedures* (G.W. Gould, pp. 285–362). Elsevier.
- Wu, C., Liu, J., Ma, J., Yan, Q., y Jiang, Z. (2021). Neogaretetraose extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* through AMPK mediated signaling pathways and activation of autophagy. *Journal of Functional Foods*, 77, 104341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104341>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klimova, B., Wan, D., y Kuca, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, 90. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Xu, Y., Bajaj, M., Schneider, R., Grage, S., Ulrich, A., Winter, J., y Gallert, C. (2013). Transformation of the matrix structure of shrimp shells during bacterial deproteination and demineralization. *Microbial Cell Factories*, 12, 90. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-90>

- Yusuf, M., Hassan, M., Abdel Daim, M., El Nabtiti, A., Ahmed, A., Moawed, S., Elsayed, A., y Cui, H. (2016). Value added by *Spirulina platensis* in two different diets on growth performance, gut microbiota, and meat quality of Japanese quails. *Veterinary World*, 9, 1287-1293. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1287-1293>
- Zanini, S., Silva-Angulo, A., Rosenthal, A., Rodrigo Aliaga, M. D., y Martínez- López, A. (2014a). Effect of citral and carvacrol on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* to antibiotics. *Letters in Applied Microbiology*, 58. <https://doi.org/10.1111/lam.12218>
- Zanini, S., Silva-Angulo, A., Rosenthal, A., Rodrigo Aliaga, M. D., y Martínez- López, A. (2014b). Influence of the Treatment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium with Citral on the Efficacy of Various Antibiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1635>
- Zargar, V., Asghari, M., y Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zarkower, D. (2006). Somatic sex determination. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_somaticsexdeterm/somaticsexdeterm.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_somaticsexdeterm/somaticsexdeterm.html)
- Zhang, X., Deyong, L., Huang, Q., He, C., y Ren, L. (2016). Effect of Mulberry Leaf Extracts on Color, Lipid Oxidation, Antioxidant Enzyme Activities and Oxidative Breakdown Products of Raw Ground Beef During Refrigerated Storage. *Journal of Food Quality*, 39, n/a - n/a. <https://doi.org/10.1111/jfq.12187>
- Zheng, S.-Q., Huang, X.-B., Xing, T.-K., Ding, A.-J., Wu, G.-S., y Luo, H.-R.

(2016). Chlorogenic Acid Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* via Insulin/IGF-1 Signaling Pathway. *The Journals of Gerontology: Series A*, 72(4), 464–472.<https://doi.org/10.1093/gerona/glw105>









# ***ANEXOS***

---



## X. ANEXOS



## In vivo Antimicrobial Activity Assessment of a Cauliflower By-Product Extract Against *Salmonella* Typhimurium

Diana Ibáñez-Peinado<sup>1</sup>, Consuelo Pina-Pérez<sup>2</sup>, Gema García-Carrión<sup>1</sup>, Antonio Martínez<sup>1</sup> and Dolores Rodrigo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (ATA-CSIC), Valencia, Spain, <sup>2</sup> Faculty of Biological Sciences, University of Valencia, Valencia, Spain

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Annelisa Sero,  
University of Teramo, Italy

#### Reviewed by:

Guadalupe Virginia Nevárez-Moorillon,  
Autonomous University of  
Chihuahua, Mexico  
Sabu Abduhameed,  
Kannur University, India

#### \*Correspondence:

Dolores Rodrigo  
lolesra@iata.csic.es

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Sustainable Food Processing,  
a section of the journal  
Frontiers in Sustainable Food Systems

Received: 11 November 2019

Accepted: 17 January 2020

Published: 07 February 2020

#### Citation:

Ibáñez-Peinado D, Pina-Pérez C,  
García-Carrión G, Martínez A and  
Rodrigo D (2020) In vivo Antimicrobial  
Activity Assessment of a Cauliflower  
By-Product Extract Against  
*Salmonella* Typhimurium.  
Front. Sustain. Food Syst. 4:8.  
doi: 10.3389/fsufs.2020.00008

The main objective of this work was to study the antimicrobial effect of a cauliflower by-product infusion into an affordable *in vivo* model (*Caenorhabditis elegans*). The infusion demonstrated some protective effect on non-infected and infected worms with *Salmonella* Typhimurium as indicated by higher survival percentile values (75, 50, 25, and 5% percentiles) as compared with those from worms unexposed to the infusion. The antimicrobial effect of the infusion was evaluated on *Salmonella* intestinal colonization of infected worms (24, 48, and 96 h post-infection). At 96 h post-infection, the concentration of *Salmonella* was reduced around 2 log cycles in infected cauliflower treated group ( $p < 0.05$ ) as compared with infected non-cauliflower group. Here we show that cauliflower by-products extend survival and have an antimicrobial effect in an *in vivo* nematode model, *C. elegans*, as a previous validation step to longer and costlier farm animal studies.

**Keywords:** agro-industrial waste, by-product, cauliflower, antimicrobial activity, *C. elegans*, *Salmonella* Typhimurium

### INTRODUCTION

Some natural antimicrobials by-products from plants (essential oils and plant extracts) have demonstrated their effectiveness against *Salmonella* Typhimurium *in vitro* (Sanz-Puig et al., 2015a; Mohamed et al., 2016). It has also been found that many vegetables in the *Cruciferae* family have antimicrobial properties against several microorganisms of clinical importance. The *in vitro* antibacterial effect of *Brassica oleracea* products on several foodborne pathogens was evidenced by Brandi et al. (2006) and Sanz-Puig et al. (2017), between others. Some of the antimicrobial properties of these plant extracts are associated with antioxidant compounds such as polyphenols (Sanz-Puig et al., 2015b; Marchese et al., 2016; Bakari et al., 2018). It is believed that the antibacterial activity of phenolic compounds is due to direct interference with bacterial growth or to inhibition of the production of virulence factors, resulting in attenuated pathogenesis (Ivanova et al., 2013).

Salmonellosis is one of the most recurrent food safety problems in the EU (100,000 cases reported/year, European Food Safety Authority (EFSA), 2014). It is a zoonotic disease or infection that can be transmitted directly or indirectly between animals and humans. *Salmonella* spp. are commonly found in the intestines of healthy birds and mammals and, in food, it is most often found in eggs and raw meat from pigs, turkeys, and chickens contaminated during the slaughterhouse process. To reduce the risk of infection, it is important to prevent the disease at the farm. Reduction

of the microbial load in the intestine of animals prior to slaughter could be a control measure for salmonellosis infections transmitted by food by reducing the level of contamination of flesh at the slaughterhouse.

Before testing the effect of antimicrobials in the intestine of farm animals, which requires resources that are sometimes substantial, some *in vivo* assays could be carried out in a more affordable system. In this way, the nematode *C. elegans* can play an interesting role as a live test organism. This organism is an invertebrate hermaphrodite nematode that feeds on bacteria and lives in the soil. Owing to the conservation of many homologous biological processes with mammals, *C. elegans* has been chosen as a test organism in many studies on the virulence effect of pathogenic bacteria (Kurz and Ewbank, 2000; Jiang and Wang, 2018). In addition, aspects of aging are similar between nematodes and mammals, including humans (Wilson et al., 2006).

The use of by-product extracts or infusions obtained from by-products offers another interesting way to comply with a circular economy by reducing and revalorizing agro-industrial residuals. Considering these findings, the use of these natural extracts in animal feed could be an alternative, non-curative, control option for the pathogenic bacteria in animal intestines.

The objective of the present work was to study the effect of a by-product infusion from *B. oleracea* var. botrytis on *C. elegans*, evaluating the survival of the infected by *Salmonella* Typhimurium and non-infected nematodes and the survival of *Salmonella* in the worm's intestine fed with the infusion.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture of Nematodes and Microbial Strains

*Caenorhabditis elegans* strain N2 was provided by the College of Biological Sciences, Minnesota University, USA. For optimal growth of the nematodes, Nematode Growth Medium (NGM) agar was used in medium-size plates (60 mm diameter) for general strain maintenance, and larger plates (100 mm diameter) for growing larger quantities of worms, with a bacterial lawn of *Escherichia coli* strain OP50 (*E. coli* OP50) at 20°C (Stiernagle, 2006). The study was performed with young adult *C. elegans* (L4 growth stage) that were previously synchronized.

*E. coli* strain OP50 was grown in Luria-Bertani broth overnight before its inoculation on NGM plates (Roth et al., 1985).

*S. Typhimurium* was provided by the Spanish Type Culture Collection (CECT 443). The *Salmonella* strain was grown in Tryptic Soy Broth (TSB) (Scharlab Chemie) and incubated for 14 h at 37°C to obtain a stock of cells.

### Preparation of Nematode Growth Medium (NGM) Agar With Cauliflower By-Product Infusion

Cauliflower infusion was made from by-product consisting of dried leaves of *B. oleracea* var. botrytis. These by-products were provided by TRASA S.L. from agro-industrial primary production.

To prepare a 3% (w/v) cauliflower infusion, 0.1% peptone water was boiled. The by-product was added when the water boiled and it was left infuse for 30 min. After that, the infusion was centrifuged at 6,000g for 15 min at 4°C. Next, it was vacuum filtered with Whatman filter paper (90 mm diameter). Finally, NGM medium with cauliflower infusion was prepared by replacing the distilled water with the infusion that had been obtained.

The concentration of 3% (w/v) cauliflower was chosen because it was the maximum that had shown *in vitro* antimicrobial activity and allowed the growth of *E. coli* OP50.

### *C. elegans* Survival Studies

For survival studies, uninfected nematodes were distributed on NGM agar with *E. coli* OP50 lawn plates (N) or on NGM agar with *E. coli* OP50 lawn supplemented with 3% cauliflower infusion plates (N\_CA).

In the same way, infected nematodes were distributed on NGM agar with *E. coli* OP50 lawn plates (I) or NGM agar with *E. coli* OP50 lawn supplemented with 3% cauliflower by-product infusion plates (I\_CA), depending on the survival study.

In all study cases (uninfected and infected nematodes), five repeats were evaluated with 5 plates each. Each plate contained 10 synchronized worms, i.e., 50 nematodes per repeat. The total number of synchronized worms used in the study was 250 for each process.

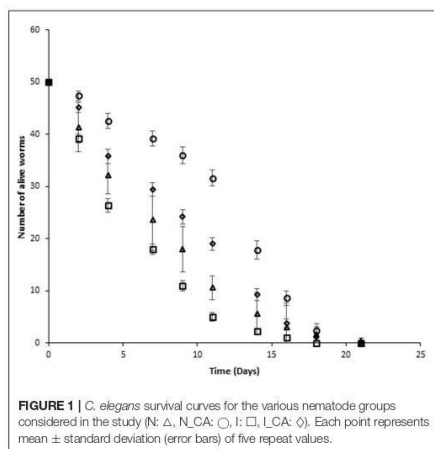
Live worms on each plate were counted every 48 h for 21 days.

### *Salmonella* Infection

For *S. Typhimurium* infection, the nematodes were transferred to plates with NGM agar and *Salmonella* Typhimurium lawn and kept in contact with the pathogen for 5 h. After that time, they were transferred to the appropriate medium for the survival study (I or I\_CA plates, for the media without or with cauliflower, respectively).

### Quantification of *S. Typhimurium* Infection in the Intestine of *C. elegans*

For the quantification of *Salmonella* Typhimurium in the digestive tract of the nematode, 5 worms infected with *Salmonella* Typhimurium were lysed 24, 48, and 96 h after feeding in the various media already described (I or I\_CA plates, for the media without or with cauliflower, respectively). For this purpose, the worms were placed in a plate of NGM medium and were washed twice with 10  $\mu$ l of M9 medium. The five washed worms were transferred to a 1.5 ml Eppendorf containing 1 ml of M9 with 1% Triton X-100 and five glass beads. Lysis of *C. elegans* contained in the Eppendorf tubes was performed by mechanical action using a vortex. The concentration of *Salmonella* (CFU/ml) in the digestive tract of *C. elegans* was obtained from lysates, which were serially diluted, and incubated in Eosin Methylene Blue agar (EMB agar) at 37°C for 48 h. Base dilutions were made from 10 to 10<sup>-4</sup> to achieve a reliable count that established the concentration of *Salmonella* sp. Presumptive colonies of lactose-negative *Salmonella* sp. were counted when bacteria showed absence of coloration in this EMB culture medium. The assay plates were prepared in duplicate.



This study was carried out in duplicate with 30 plates, with one synchronized nematode in each plate.

### Statistical Analysis

The analysis of experimental data of microbial counts and survival curves was carried out by using Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., USA). Kaplan Meyer analysis was performed for survival curves. The statistical significance of the microbial counts was determined by ANOVA.

## RESULTS

### Effect of Cauliflower By-Product Extract Infusion on Uninfected *C. elegans*

The survival curves for the various nematode groups under study until all the nematodes died are shown in **Figure 1**, **Table S1**. As can be seen, from the second day until the end of the study (21 days) the number of live nematodes at each defined length of time was significantly higher for the uninfected nematode group fed with cauliflower extract (N\_CA) than for the control (N) group ( $p < 0.05$ ). These findings in the survival curve were patent when the percentiles were analyzed (**Table 1**).

Although the number of live nematodes decreased with time until the end of the 21 days, 50 percent of the uninfected worms fed on 3% cauliflower extract (N\_CA) survived for a length of time equal to 12.4 days, whereas in the control group (N) 50 percent of the worms survived for a length of time equal to 6.9 days. The difference in survival between the two groups was still maintained until the fifth percentile, with values of  $16.65 \pm 3.3$  and  $17.9 \pm 2.8$  days for the control (N) and cauliflower-fed (N\_CA) groups, respectively. Thus, the presence of cauliflower

**TABLE 1** | Percentiles of *C. elegans* lifespan for the various nematode groups considered in the study.

Percentile (%)	Survival time (days, standard deviation)			
	N	N_CA	I	I_CA
75	$3.81 \pm 1.5$	$7.8 \pm 2.6$	$2.2 \pm 0.6$	$3.6 \pm 0.8$
50	$6.92 \pm 2.0$	$12.4 \pm 0.9$	$4.4 \pm 1.8$	$8.8 \pm 1.8$
25	$11.52 \pm 2.0$	$15.1 \pm 1.3$	$8.8 \pm 1.9$	$13.0 \pm 1.6$
5	$16.65 \pm 3.3$	$17.9 \pm 2.8$	$13.7 \pm 1.0$	$17.0 \pm 1.8$

Values represent the survival time (days  $\pm$  standard deviation) at the 75, 50, 25, and 5% percentiles in each study treatment.

in the feed medium appears to decrease the death rate of the nematodes at each time interval tested.

### Effect of Infection With *Salmonella Typhimurium* on *C. elegans*

As shown in **Figure 1**, infection produced a statistically significant ( $p < 0.05$ ) reduction in live nematodes for a defined length of time in the I group in comparison with the uninfected N control group, both fed on standard Nematode Growth Medium. Percentile analysis (**Table 1**) indicated the difference for the 50th percentile between the uninfected group (N) ( $6.9 \pm 2.0$  days) and the infected group (I) ( $4.4 \pm 1.8$  days). This difference in lifespan between the N and I groups was also observed for the 75, 25, and 5th percentiles, where the worms were very close to the limit of their lifespan. These results indicate that *Salmonella* infection affected the survival of *C. elegans*.

### Effect of Cauliflower By-Product Extract Infusion on *C. elegans* Infected by *Salmonella Typhimurium*

When infected worms were fed on a medium containing cauliflower by-product infusion (I\_CA group), differences in the survival curve were patent compared with that of the infected group fed without the infusion (I) and the control group (N) (**Figure 1**). A statistically significant ( $p < 0.05$ ) increase in survival after defined periods of time was observed for the I\_CA group, although the increase was lower than that observed in the uninfected group fed with cauliflower by-product infusion (N\_CA). This increase in survival was reflected in all percentiles, as can be seen in **Table 1**. According to this table, 50 percent of the worms survived for a period of time equal to  $8.8 \pm 1.8$  days in the I\_CA group, while in the I group they survived for a length of time equal to  $4.4 \pm 1.8$  days. Again, the cauliflower extract appears to have had a beneficial effect on *C. elegans*, extending the survival for a certain length of time. According to these results, it is important to know how *Salmonella* evolves in the worm's intestine after infection and to try to determine whether the extract could exert its antimicrobial effect inside the nematode's intestine or not, before considering its use as a control measure before animals are subjected to the slaughterhouse process.



## Quantification and Evolution of *S. Typhimurium* Infection in the Intestine of *C. elegans*

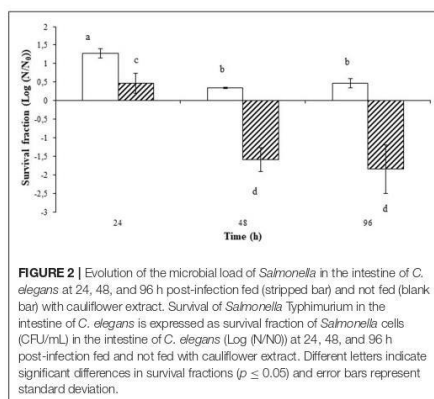
The evolution of the *Salmonella* counts in the nematode's intestine expressed as log (N/N0) for the two groups, infected (I) and infected fed with cauliflower extract (I\_CA), can be seen in Figure 2, Table S2.

It was observed that *Salmonella* grew until the fraction reached 1.25 log in the I group 24 h after infection, while for the I\_CA *Salmonella* counts increased only 0.5 log cycles, being significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between both populations for the same period of time. This means that an increase in *Salmonella* survival in the *C. elegans* digestive system took place during the first 24 h post-infection period, irrespective of the group considered, but some control of *Salmonella* growth was exerted by the cauliflower extract that it only increased 0.5 log cycles. *Salmonella* growth decreased at 48 h after infection and remained stable until 96 h after infection in worms not fed with cauliflower extract. When worms infected with *Salmonella* were fed with cauliflower extract, death of *Salmonella* was observed at 48 and 96 h and counts were significantly lower ( $p \leq 0.05$ ) than in nematodes infected but not fed with cauliflower extract (Figure 2). Cauliflower extract acted as an antimicrobial in the nematode's intestine, reducing the microbial survival fraction by about two log cycles.

According to these results, it is possible to say that the presence of cauliflower by-product infusion in NGM agar appears to control infection of the *C. elegans* digestive tract by *S. Typhimurium*.

## DISCUSSION

It has been reported that the lifespan of *C. elegans* is related with genetic and environmental factors, such as temperature, food



availability and composition (Blumenthal and Steward, 1997; Uno and Nishida, 2016). According to Sanz-Puig et al. (2015a) and Vieira (2013), cauliflower by-product infusion provides bioactive compounds such as polyphenols. It has been found that polyphenols contained in hydrophilic extracts of Brassica species are responsible for 80–95% of their total antioxidant capacity (Kurlich et al., 2002; Xianli et al., 2004). According to different authors (Kampkötter et al., 2008; Saul et al., 2011; Surco-Laos et al., 2011; Grünz et al., 2012; Kim et al., 2014), cauliflower polyphenols such as gallic acid, catechin, protocatechuic acid, quercetin and kaempferol prolonged the lifespan of *C. elegans* between 5.6 and 15% and produced some stress protection. However, other studies reported protection against thermal stress but no protection against acute oxidative stress (Wilson et al., 2006) or extended *C. elegans* lifespan (Chen et al., 2013).

Studies with other compounds rich in polyphenols showed that they increased the lifespan and thermotolerance of *C. elegans* (Wilson et al., 2006; Pallauf et al., 2017). After studying the effect of an herbal mixture on *C. elegans*, Moriwaki et al. (2013) concluded that the herbal mixture prolonged its lifespan, delayed aging, and also suppressed oxidation of protein cells in the nematode. However, it appears that the longevity of the *C. elegans* mev-1 (kn1) mutant produced by gallic acid, which is present in cauliflower, was not due to its antioxidant capacity but to its antimicrobial properties (Saul et al., 2011). All these findings may help to explain why the cauliflower extract infusion clearly reflected a positive influence on the *C. elegans* lifespan of N\_CA and I\_CA compared with the N and I control groups.

At the same time, it has been demonstrated that *S. Typhimurium* shortened the survival of *C. elegans* (Aballay et al., 2000; Labrousse et al., 2000; Sem and Rhen, 2012). Fifty percent of L4-stage worms were alive about 9 days after being exposed to *S. Typhimurium* strain 12023 for 8 h and then returned to an *E. coli* OP50 lawn as feeding material (Labrousse et al., 2000). Aballay et al. (2000) used 1-day adult nematodes exposed to *S. Typhimurium* for their study and found that 50% of the nematodes were dead at 5.1 days when exposed to *S. Typhimurium* SL 1344 or 4.8 days when infected by *S. Typhimurium* 14028. In our study, 50% of the worms survived for 4.4 days in the case of nematodes infected by *S. Typhimurium* (CECT 443) without cauliflower extract exposure. These results are in agreement with the above-mentioned studies, although some authors have indicated that factors such as difference in culture temperature, inter-individual differences, and/or use of different *Salmonella* strains could affect survival of the nematode (Blumenthal and Steward, 1997). The virulence mechanism may be due to intracellular infection in the host, although Sem and Rhen (2012) described a new form of virulence that depends on the ability to induce overwhelming oxidative stress in the host through redox activity of bacterial thioredoxin 1 without intracellular invasion.

In the present work, a similar protective effect of the cauliflower extract on the infected nematodes was observed. *C. elegans* can use various strategies against *S. Typhimurium* infection (Alegado and Tan, 2008; Sem and Rhen, 2012; Curt et al., 2014). One defensive mechanism of *C. elegans* against this

pathogen is production of reactive oxygen species (ROS) while inducing an oxidative stress response that depends on DAF-16, a transcriptional factor (Chávez et al., 2007). Sem and Rhen (2012) indicated that the presence of 50 mM of ascorbic acid reduced the ROS response and significantly increased the lifespan of nematodes infected with *S. Typhimurium* by 2 days at 50% survival time, compared to the uninfected group. Vayndorf et al. (2013) noticed increased resistance to *Pseudomonas aeruginosa* in *C. elegans* pre-treated with whole apple extracts (2 days pre-treatment) as well as greater lifespan in a dose-dependent manner compared with infected non-pre-treated worms. They suggested that the pre-treatment with apple extract produced an increase in survival of up to 35.2% in infected worms, and also that the apple extract enhanced the nematode immune response.

In the present study, the presence of cauliflower extract extended survival by 4 days in infected nematodes at 50% survival time. This result could indicate that the presence of the cauliflower extract would produce the same effect as vitamin C in reducing the ROS response, or maybe an enhancement of the nematode immune response. It is necessary to take into account the fact that polyphenols are one of the main groups of bioactive components in cruciferous vegetables (Soengas et al., 2011). They have been related to antioxidant properties in *C. elegans*, inducing resistance to oxidative stress and delaying aging (Wu et al., 2002; Cañuelo et al., 2012).

In recent years, *Salmonella* infection has reached dramatic levels and has become a challenge in the food sector. The use of antibiotics worldwide has resulted in an increase in antibiotic resistance; consequently, new antimicrobials are necessary to avoid resistance problems with antibiotics used in human therapy. Researchers have focused efforts on the therapeutic activities of natural products from plants. There are many plant essential oils and other products from plants that can be used to control bacteria, including *Salmonella* (Bajpai et al., 2012). Essential oils added to feed or water have been used to control fecal excretion of *Salmonella*, with promising results (Borsoi et al., 2011). The authors just cited, used live animals for their trials. However, there are no studies in which cauliflower extract has been used to control *Salmonella* in the intestine of living animals. The use of live animals for trials can be expensive, so to test the effect of natural antimicrobials from plants in the intestine of infected living beings such as the *C. elegans* nematode, can be useful as a living test organism before performing field tests. The results of the present study indicate that *Salmonella* can infect the intestine of *C. elegans*. Aballay et al. (2000) reported *S. Typhimurium* and *E. coli* bacteria counts (log CFU/worm) in *C. elegans* intestine during a period of 5 days. At day 1, intestinal *Salmonella* grew by ~1.5 log cycles. The pathogenic bacteria counts almost doubled on the second day, and they seemed to stabilize on the third day, when a 3.5 log cycle growth was achieved. In agreement with those findings, in the present work, infected worms showed around a 1.25 log increase in *Salmonella* cells at day 1; however, in contrast with the results of Aballay et al. (2000), the *Salmonella* cells decreased by ~1 log cycle 48 h after infection, with a non-significant increase 96 h after pathogen exposure. The differences encountered in the two studies for untreated infected nematodes

at 48 h and 96 h post-infection may have been due to the different *S. Typhimurium* strains used in the two studies or other factors.

Marsh et al. (2011) indicated approximate counts of  $10^4$  CFU of *S. Typhimurium* strain L1019 (a GFP-expressing derivative of SL1344) in every L4-stage *C. elegans* (CFU/worm) at day 1 post-infection. This datum is in accordance with the mean *S. Typhimurium* cell counts ( $2.97 \times 10^4$  CFU/worm) found in the present study. However, although Marsh et al. (2011) showed a rise in pathogen concentration to  $\sim 10^7$  CFU/worm at day 2, our results demonstrated a mean CFU/worm decrease to  $1.71 \times 10^3$  CFU/worm. Interestingly, both studies show a similar concentration of *Salmonella* cells around  $10^3$ - $10^4$  CFU/worm at day 4. Consequently, from the results presented, it seems that *C. elegans* can be used to test the efficacy of cauliflower extract in controlling *Salmonella* in infected nematodes.

## CONCLUSIONS

In conclusion it can be said that cauliflower extract exerts a protective action against aging in uninfected worms, probably owing to an antioxidant activity of the compounds in the extract. This protective effect was also shown in *Salmonella*-infected worms. Results at the 2nd and 4th days post-infection showed a positive effect of cauliflower treatment in lifespan extension related with a nearly 2 log cycle reduction in *Salmonella* cells at 48 h and even at 96 h after infection with the pathogen. Therefore, an interesting feature demonstrated in this study is the effect of cauliflower extract as feed material in controlling *Salmonella* in the worm intestine by reducing the microbial load after 96 h. Nevertheless, more information is needed on possible pathogen resistance to this natural antimicrobial in relation to time.

In order to optimize the incorporation of this vegetable extract with antimicrobial properties, these findings should be corroborated and completed with experimental studies in farm animals, adapting it to the necessities of each animal species. The use of agro-industrial waste to obtain the vegetable extracts contributes to sustainable agriculture development as well as a possible economic revalorization of these residues.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

DR: conceptualization and experimental design. AM: writing. GG-C: experimental analysis. DI-P: experimental and data analysis. CP-P: paper supervision.

## FUNDING

This work was supported by funds provided by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities



(AGL2017-86840-C2-2-R), and with FEDER funds from EU. We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

## REFERENCES

- Aballay, A., Yorgey, P., and Ausubel, F. M. (2000). *Salmonella* Typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 10, 1539–1542. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00830-7
- Alegado, R. A., and Tan, M. W. (2008). Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella* Typhimurium in the *C. elegans* intestine. *Cell. Microbiol.* 10, 1259–1273. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01124.x
- Bajpai, V. K., Bak, K. H., and Kang, S. C. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: a review. *Food Res. Int.* 45, 722–734. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.052
- Bakari, S., Hijaoui, H., Daoud, A., Mighri, H., Maria Ross-García, J., Gharsallah, N., et al. (2018). Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials and LC-MS analysis of hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of *Erodium glaucophyllum* collected from Tunisian Sahara. *Food Sci. Technol.* 38, 310–317. doi: 10.1590/fst.04517
- Blumenthal, T., and Steward, K. (1997). "RNA processing and gene structure," in *C. elegans II*, 2nd Edn, eds D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer, and J. R. Priess (New York, NY: Cold Spring Harbor), 117–145.
- Borsoi, A., Santos, L. R., Diniz, G. S., Salle, C. T. P. C., Moraes, H. L. S., and Nascimento, V. P. (2011). *Salmonella* fecal excretion control in broiler chickens by organic acids and essential oils blend feed added. *Brazil. J. Poultry Sci.* 13, 65–69. doi: 10.1590/s1516-635x2011000100010
- Brandi, G., Amagliani, G., Schiavano, G. F., De Santi, M., and Sisti, M. (2006). Activity of *Brassica oleracea* leaf juice on foodborne pathogenic bacteria. *J. Food Protect.* 69, 2274–2279. doi: 10.4315/0362-028x-69.9.2274
- Cañuelo, A., Gilbert-Lopez, B., Pacheco-Linan, P., Martínez-Lara, E., Siles, E., and Miranda-Vizuete, A. (2012). Tyrosol, a main phenol present in extra virgin olive oil, increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Age. Dev.* 133, 563–574. doi: 10.1016/j.mad.2012.07.004
- Chávez, V., Mohri-Shiomi, A., Maadani, A., Vega, L. A., and Garsin, D. A. (2007). Oxidative stress enzymes are required for DAF-16-mediated immunity due to generation of reactive oxygen species by *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176, 1567–1577. doi: 10.1534/genetics.107.072587
- Chen, W., Rezaizadehnajafi, L., and Wink, M. (2013). Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 682–688. doi: 10.1111/jphp.12023
- Curt, A., Zhang, J., Minnerly, J., and Jia, K. (2014). Intestinal autophagy activity is essential for host defense against *Salmonella* Typhimurium infection in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 214–218. doi: 10.1016/j.dci.2014.03.009
- European Food Safety Authority (EFSA). (2014). *EFSA Explains Zoonotic Diseases: Salmonella*. Available online at [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsalmonella.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf) (accessed January 28, 2020).
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S. E., Daniel, H., et al. (2012). Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech. Age. Dev.* 133, 1–10. doi: 10.1016/j.mad.2011.11.005
- Ivanova, K., Fernandes, M., and Tzanov, T. (2013). "Current advances on bacterial pathogenesis inhibition and treatment strategies," in *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology, and Education*, ed A. Méndez-Vilas (Badajoz: Formatex Research Center), 322–336.
- Jiang, H., and Wang, D. (2018). The microbial zoo in the *C. elegans* intestine: bacteria, fungi, and viruses. *Viruses* 10, 85. doi: 10.3390/v10020085
- Kampköter, A., Timpel, C., Zurawski, R. F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., et al. (2008). Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 314–323. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.10.004
- Kim, Y. S., Seo, H. W., Lee, M. H., Kim, D. K., Jeon, H., and Cha, D. S. (2014). Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Archiv. Pharm. Res.* 37, 245–252. doi: 10.1007/s12272-013-0183-6
- Kürlich, A. C., Jeffery, E. H., Juvik, J. A., Wallig, M. A., and Klein, B. P. (2002). Antioxidant capacity of different broccolis (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J. Agri. Food Chem.* 50, 5053–5057. doi: 10.1021/jf025535l
- Kurz, C. L., and Ewbank, J. J. (2000). *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* 8, 142–144. doi: 10.1016/s0966-842x(99)01691-1
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C. L., and Ewbank, J. J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella* Typhimurium. *Curr. Biol.* 10, 1543–1545. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00833-2
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., et al. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chem.* 210, 402–414. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.111
- Marsh, E. K., van den Berg, M. C. W., and May, R. C. (2011). A two-gene balance regulates *Salmonella* Typhimurium tolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 6:e16839. doi: 10.1371/journal.pone.0016839
- Mohamed, H., Gaafar, A., and Soliman, A. (2016). Antimicrobial activities of essential oil of eight plant species from different families against some pathogenic microorganisms. *Res. J. Microbiol.* 11, 28–34. doi: 10.3923/rjm.2016.28.34
- Moriwaki, T., Kato, S., Kato, Y., Hosoki, A., and Zhang-Akiyama, Q. M. (2013). Extension of lifespan and protection against oxidative stress by an antioxidant herb mixture complex (KPG-7) in *Caenorhabditis elegans*. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 53, 81–88. doi: 10.3164/jcbn.13-11
- Pallau, K., Duckstein, N., and Rimbach, G. (2017). A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms. *Proc. Nutr. Soc.* 76, 145–162. doi: 10.1017/S0029665116000720
- Roth, R. I., Owen, R. L., Keren, D. F., and Volberding, P. A. (1985). Intestinal infection with *Mycobacterium avium* in acquired immune-deficiency syndrome (AIDS)—histological and clinical comparison with whipples disease. *Digest. Dis. Sci.* 30, 497–504. doi: 10.1007/BF01318186
- Sanz-Puig, M., Lazaro, E., Armero, C., Alvares, D., Martínez, A., and Rodrigo, D. (2017). *S. Typhimurium* virulence changes caused by exposure to different non-thermal preservation treatments using *C. elegans*. *Int. J. Food Microbiol.* 262, 49–54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.006
- Sanz-Puig, M., Pina-Pérez, M. C., Criado, M. N., Rodrigo, D., and Martínez-López, A. (2015a). Antimicrobial potential of cauliflower, broccoli, and okara byproducts against foodborne bacteria. *Foodborne Pathogens Dis.* 12, 39–46. doi: 10.1089/fpd.2014.1801
- Sanz-Puig, M., Pina-Pérez, M. C., Saenz Gomez, J., Marañón, I., Rodrigo, D., Martínez, A. (2015b). Effect of polyphenol content on the antimicrobial activity of natural extracts from agroindustrial by-products. *J. Food Safety Food Qual.* 66, 4–9. doi: 10.2376/0003-925X-66-4
- Saul, N., Pietsch, K., Stürzenbaum, S. R., Menze, R., and Steinberg, C. E. W. (2011). Diversity of polyphenol acid in *Caenorhabditis elegans* between toxicity and longevity. *J. Nat. Prod.* 74, 1713–1720. doi: 10.1021/jp200011a
- Sem, X., and Rhen, M. (2012). Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* relies on disseminated oxidative stress in the infected host. *PLoS ONE* 7:e45417. doi: 10.1371/journal.pone.0045417
- Soengas, P., Sotelo, T., Velasco, P., and Carrea, M. E. (2011). Antioxidant properties of *Brassica* vegetables. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.*

- 5, 43–55. Available online at: <https://pdfs.semanticscholar.org/14af/a996f8e8609f9209e51ab0ffe4d9722d25a.pdf>
- Stiernagle, T. (2006). *Maintenance of C. elegans*. *WormBook*. Available online at: [http://wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html) (accessed 10 October, 2019). doi: 10.1895/wormbook.1.101.1
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gomez-Orte, E., Gonzalez-Manzano, S., Gonzalez-Paramas, A. M., Santos-Buedga, C., et al. (2011). Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan, and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Func.* 2, 445–456. doi: 10.1039/c1fo10049a
- Uno, M., and Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *NPJ Aging Mech. Dis.* 2:16010. doi: 10.1038/npjamd.2016.10
- Vayndorf, E. M., Lee, S. S., and Liu, R. H. (2013). Whole apple extracts increase lifespan, healthspan, and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *J. Func. Foods* 5, 1235–1243. doi: 10.1016/j.jff.2013.04.006
- Vieira, P. M. (2013). *Avaliação da composição química, dos compostos bioativos e da atividade antioxidante em seis espécies de flores comestíveis* Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 102f. Available online at: <http://hdl.handle.net/11449/100866>
- Wilson, M. A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D. K., Joseph, J. A., and Wolkow, C. A. (2006). Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5, 59–68. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00192.x
- Wu, Z. X., Smith, J. V., Paramasivam, V., Butko, P., Khan, I., Cypser, J. R., et al. (2002). *Ginkgo biloba* extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol.* 48, 725–731.
- Xianli, W., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., and Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agri. Food Chem.* 52, 4026–4037. doi: 10.1021/jf049696w
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Copyright © 2020 Ibáñez-Peñado, Pina-Pérez, García-Carrión, Martínez and Rodrigo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## RESEARCH ARTICLE

# Antimicrobial effect of insect chitosan on *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* survival

Diana Ibañez-Peinado, María Ubeda-Manzanaro, Antonio Martínez, Dolores Rodrigo\*

Department of Preservation and Food Safety, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Valencia, Spain

\* lolesra@iata.csic.es



## OPEN ACCESS

**Citation:** Ibañez-Peinado D, Ubeda-Manzanaro M, Martínez A, Rodrigo D (2020) Antimicrobial effect of insect chitosan on *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* survival. PLoS ONE 15(12): e0244153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153>

**Editor:** Filippo Giarratana, University of Messina, ITALY

**Received:** September 15, 2020

**Accepted:** December 4, 2020

**Published:** December 22, 2020

**Copyright:** © 2020 Ibañez-Peinado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information files](#).

**Funding:** The authors are grateful to the Spanish Ministry of Science for funding through project AGL2017-86840-C2-2-R, and to FEDER funds from EU. The funders had no role in study design, data collection and analysis decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The antimicrobial capability of chitosan from *Tenebrio molitor* as compared with chitosan from crustacean (*Penaeus monodon*) on different pathogenic microorganisms of concern in food safety was studied. The antimicrobial effect was tested at pH 5 and pH 6.2 and at two different initial concentrations ( $10^3$  or  $10^6$  CFU/mL). Results indicated that chitosan from both sources have antimicrobial activity, although the effect depended on the microorganism considered (*Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7). Our results indicated that *Salmonella* was the most resistant bacteria, and that chitosan from insect was less active than chitosan from crustacean, especially against *Salmonella*. Another important factor on antimicrobial activity was the pH of the sample. When chitosan was added to a solution with a pH of 6.2 it was more active against *Listeria* and *Escherichia coli*, than at pH 5.00. Besides, the effect of chitosan appears to decrease with the incubation time, since some increases in counts were observed on *E. coli* and *Salmonella* after the 24 and 49 hours of incubation.

## Introduction

Chitosan is a natural and biodegradable biopolymer that has been used in different industrial applications as flocculating and chelating agent, permeability control agent or antimicrobial substance, among others [1–3]. Today, chitosan is mainly produced on an industrial scale from deacetylation of chitin, this is present in the exoskeleton of crustaceans and insects and in the cell walls of most fungi and some algae [4]. Although residues from crab, prawns, crayfish and shrimps are the main source of chitin [4], the importance of insect chitosan is due to the role that insects play as a sustainable source of protein. Insects are seen as an alternative to the proteins that are conventionally consumed and that come mainly from traditional livestock (cows, chickens or pigs fundamentally) and fish. Besides, the use of insect as protein source will produce two by-side products of undoubted industrial interest, lipids (30–40% total dry weight) [5], that could be used as biofuel and a residual material composed fundamentally by chitin which have some bioactive properties and from which chitosan can be obtained.

**Competing interests:** The authors declare that no competing interests exist.

Chitin and chitosan have interesting physicochemical, biological and mechanical properties [6]. One of those properties of chitosan is related with its antimicrobial activity. There are diverse studies in which the antimicrobial and antifungal properties of chitosan and several of its derivatives have been revealed [7, 8]. More recently, the effect of the physical form of chitosan on its antibacterial activity against pathogenic bacteria has been studied [9]. Serio et al. [10] studied the chitosan coating as inhibitor of *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) on vacuum-packed pork loins and Brown et al. [11] on fresh cheese. It has been also reported that the antibacterial action is usually rapid and eliminates bacteria in few hours [12].

As far as physical properties of chitosan, they are governed, fundamentally, by two factors; the degree of deacetylation and the molecular weight. Moreover, the natural origin as well as the variability on their chemical structure can affect the properties of chitosan and could impact on their industrial utilization [13]. Some studies have revealed that the degree of deacetylation has been associated with the antimicrobial activity of chitosan [14].

Pathogenic microorganisms as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium or *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 are of concern under the point of view of food safety. Those microorganisms are present in a broad range of foodstuffs contributing every year to a huge amount of food transmitted illnesses. In 2018 (the latest year for which EU data is available), a total of 5.146 disease outbreaks were identified, with bacteria and their toxins being the main causative agent. *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* are among the main pathogens linked to foodborne outbreaks in Europe (2011–2020) [15]. *Salmonella enterica* is generally acquired from contaminated food and is a common cause of human gastroenteritis and bacteremia worldwide [15–17]. The common reservoir of *Salmonella* is the intestinal tract of a wide range of domestic and wild animals, which results in a variety of foodstuffs covering both food of animal and plant origin as sources of infection. Transmission often occurs when organisms are introduced in food preparation areas and are allowed to multiply in food, e.g., owing to inadequate storage temperatures, inadequate cooking, or cross-contamination of ready-to-eat (RTE) food [18, 19]. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is one of the most common serovars associated with clinically reported salmonellosis in humans, accounting for at least 15% of infections [20].

*E. coli* O157:H7 produces verotoxins. This bacterium is the major serotype that was recognized as a cause of human illness, but not in cattle, its primary host [21, 22]. The source of infection is the contamination of food such as raw or undercooked meat products and raw milk by human and animal feces [23]. The most common sources of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O157 infection are beef and leafy vegetables [24], but fresh-pressed apple juice or cider, yoghurt, cheese, salad vegetables, and cooked maize have also been implicated [25].

*L. monocytogenes* is an opportunistic pathogen that has been recognized as an important foodborne pathogen since the early 1980s [26]. It is resistant to diverse environmental conditions and can grow at temperatures as low as 3°C [27, 28]. *L. monocytogenes* can cause invasive disease in livestock, mainly sheep, goats, and cattle [29]. It is found in a wide variety of raw and processed foods such as milk and cheeses, meat (including poultry) and meat products, and seafood and fish products where it can survive and multiply rapidly during storage [30, 31].

Therefore, control measures should be taken to avoid foodborne outbreaks. Synthetic antimicrobials are each time more refused by the consumer worried by the toxicity of those products. In consequence, people are looking for new natural antimicrobials to help in controlling those pathogenic microorganisms. The control of those microorganisms can be carried out by using natural antimicrobials as chitosan to be used in different foodstuffs reducing in this way the annual cases of illnesses transmitted by foods [32–34].



Considering the previously exposed antecedents, a comparative study of the antimicrobial activity of chitosan from *Tenebrio molitor* as an alternative to crustacean chitosan at different pH levels against *E. coli*, *L. monocytogenes* and *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium at different inoculation sizes was carried out.

## Materials and methods

### Microbial strains

Pure cultures of *Listeria monocytogenes* serovar 4b (Spanish Type Culture Collection (CECT) 4032) (*L. monocytogenes*), *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 5947) (*E. coli*) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (CECT 443) (*S. Typhimurium*) were provided by the Spanish Type Culture Collection. Following the procedure described by Sanz-Puig et al. [35], lyophilized samples (0.5 g lyophil) were rehydrated in Tryptone Soy Broth (TSB) (Scharlab S.A., Barcelona, Spain) (*L. monocytogenes* and *S. Typhimurium*) or in Luria Broth (LB) (Scharlab S.A., Barcelona, Spain) (*E. coli*). Rehydrated cultures were transferred to 500 mL of its corresponding media and incubated in a bath shaker (200 rpm) for 14 h at 37°C. After centrifugation process, glycerinated bacteria cells were maintained in frozen cryovials at -80°C. The final inoculums concentration was determined by plate count and was of  $10^8$ – $10^9$  colony forming units/mL (CFU/mL).

### Chitosan samples preparation

Crustacean chitosan (chitosan from shrimp shells, practical grade) was purchased from Merck (MerckKGaA, Darmstadt, Germany) and insect chitosan (*Tenebrio molitor*) was acquired from MealFood Europe S.L. (Doñinos de Salamanca, Salamanca, Spain). For both chitosans, a 1% (w/v) chitosan sample stock solution was prepared in a 1% (v/v) acetic acid solution. Chitosan solutions at 0.15% (w/v) were prepared from the 1% (w/v) chitosan stock solution (crustacean or insect) in 1% (v/v) acetic acid. Each stock solution was sterilized by 0.45 µm pore size membrane filters.

### Evaluation of antimicrobial activity of chitosan

The antimicrobial activity was tested at pH 5 and pH 6.2 by acidifying with acetic acid (1% w/v) LB for *E. coli* and TSB for *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* studies and at two different initial concentrations,  $10^3$  or  $10^6$  CFU/mL ( $3.2 \times 10^3$  and  $2.7 \times 10^6$  CFU/mL, respectively). Microbial growth at these conditions was compared with the one of control samples (without chitosan). Acetic acid controls (LB and TSB at pH 5 and pH 6.2) were also tested to evaluate the possible antimicrobial effect of acidification.

In order to carry out the experiment, each microorganism maintained in cryovials at -80°C was thawed and serial dilutions in peptone water (0.1% (w/v)) were performed until the desired initial inoculum concentration was achieved ( $10^3$  or  $10^6$  CFU/mL). Inoculated media (LB or TSB) were incubated in a bath shaker at 37°C for 49h and sampled at  $t_0 = 0$ h,  $t_1 = 3$ h,  $t_2 = 6$ h,  $t_3 = 8$ h,  $t_4 = 24$ h and  $t_5 = 49$ h. Samples removed at each time were serially diluted in peptone water (0.1%), plated by duplicate and incubated in Luria Agar (LA) (*E. coli*) or Tryptone Soy Agar (TSA) (*S. Typhimurium* and *L. monocytogenes*) at 37°C for 24h (*E. coli* and *S. Typhimurium*) or 48h (*L. monocytogenes*). After the incubation period, bacteria cells were counted (CFU/mL). Experimental results were shown as log<sub>10</sub> of survival fraction (log S) calculated as (Eq 1):

$$\log S = -\log_{10} \left( \frac{N}{N_0} \right) \quad (1)$$

where  $N$  is bacterial concentration (CFU/mL) at time  $t$  (h) and  $N_0$  initial bacterial concentration (CFU/mL) ( $t_0$ ). Therefore, positive values indicate microbial growth and negative values microbial inactivation respect the initial inoculation value ( $N_0$ ).

### Statistical analysis

For each condition, three independent repetitions were performed and for each sampling time, two duplicates were taken, plating each one in duplicate (4 plates/sampling time). The analysis of experimental data was carried out by using Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., USA). Outliers were identified and removed prior data analysis. The statistical significance of data was determined by an Analysis of Variance (ANOVA) ( $p < 0.05$ ) and differences between groups were determined by Tukey test.

## Results

### Factors affecting antimicrobial activity of chitosan solutions

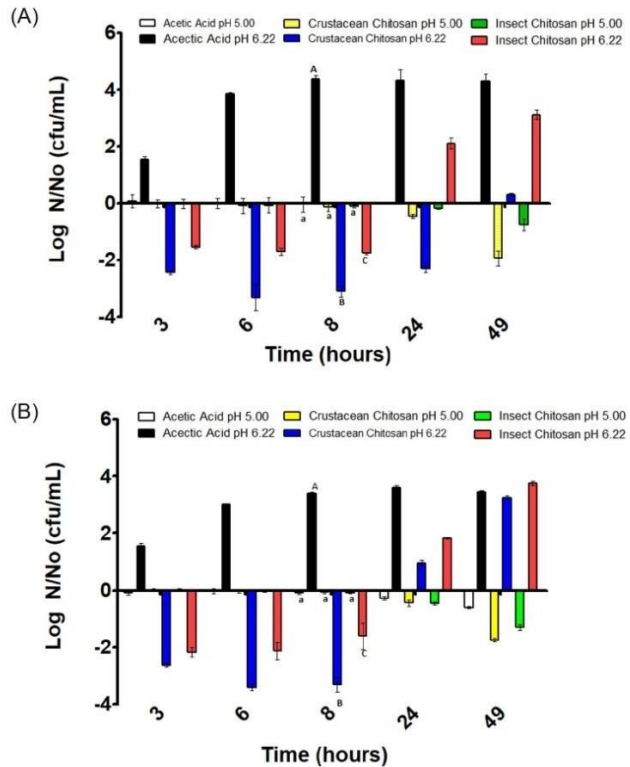
Results on the effect of acetic acid and chitosan from different sources on the behavior of *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* can be seen in Figs 1–3. In general, the response of tested microorganisms to the different antimicrobials and pH conditions was microorganism dependent. To determine the possible antimicrobial effect of chitosan from different sources dissolved in acetic acid, acetic acid control solutions at pH 5 and 6.2 were tested as antimicrobials for comparison purposes and to define the impact of chitosan independently of the antimicrobial activity of acetic acid used to dissolve chitosan.

### Antimicrobial effects of chitosan solutions on *E. coli*

For *E. coli* studies with an initial contamination level of  $10^3$  CFU/mL, the acetic acid solution at pH 5 resulted in a non-substantial variation on microbial counts during the whole incubation period, 49 h (Fig 1A). A similar result was observed when the inoculum size was  $10^6$  CFU/mL (Fig 1B). As for pH 6.2, *E. coli* cells grew until reach a plateau at the 8 hour of incubation; probably due to the pH 6.2 represent a more favorable environment for the microorganism (Fig 1A). For an initial inoculum size of  $10^6$  CFU/mL the behavior of cells was similar than that at the lower initial microbial concentration. Cells grew until reach the stationary phase at the 8 hours of incubation (Fig 1B).

Regarding the effect of chitosan from crustacean and insect sources at pH 5 against *E. coli*, non-appreciable variation on the microbial counts was observed along the incubation period, except at the 49 hours of incubation a light reduction on the microbial counts was observed, being that reduction highest for crustacean chitosan than for insect chitosan (Fig 1A and 1B). Although, this reduction could be due to the decline phase after a stationary phase and not to the presence of chitosan. As for the effect at pH 6.2, the addition of chitosan produced a decrease in the number of cells that was highest in the case of chitosan from crustacean than from insect. However, after 8 hours of incubation, an increase in the microbial counts was observed until the 49 hours of incubation, being the level of microbial concentration higher than one at time zero.

In general, considering both pH levels, the behavior of *E. coli* was independently of the initial inoculum size. In consequence, it can be considered that the inoculum size did not affect the microbial pattern along the incubation time.



**Fig 1. Variation of *E. coli* concentration in substrates inoculated with  $10^3$  CFU/mL (A) and  $10^6$  CFU/mL (B).** Positive values indicate growth and negative values inactivation respect the initial inoculation value ( $N_0$ ). Different letters mean significant differences between samples of the same pH.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.g001>

### Antimicrobial effects of chitosan solutions on *L. monocytogenes*

Results for *L. monocytogenes* can be seen in Fig 2A and 2B for a  $10^3$  and  $10^6$  CFU/mL initial concentration level, respectively.

Acetic acid solution at pH 5 produced a decrease in the microbial counts during the incubation period regardless the initial concentration level of *L. monocytogenes*. Nevertheless, the number of log reductions was higher when the inoculum size was  $10^6$  CFU/mL (Fig 2A and 2B). This result appears to indicate that there is a clear bactericidal effect of the acetic acid against this microorganism. On the other hand, when *L. monocytogenes* cells were treated with acetic acid at a pH of 6.2, cells grew reaching the stationary phase after 8 hours of incubation.



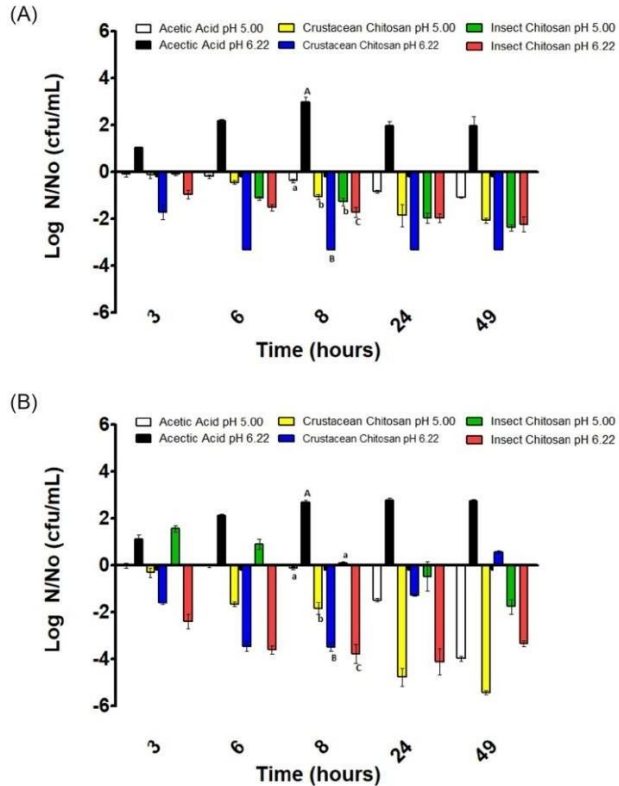


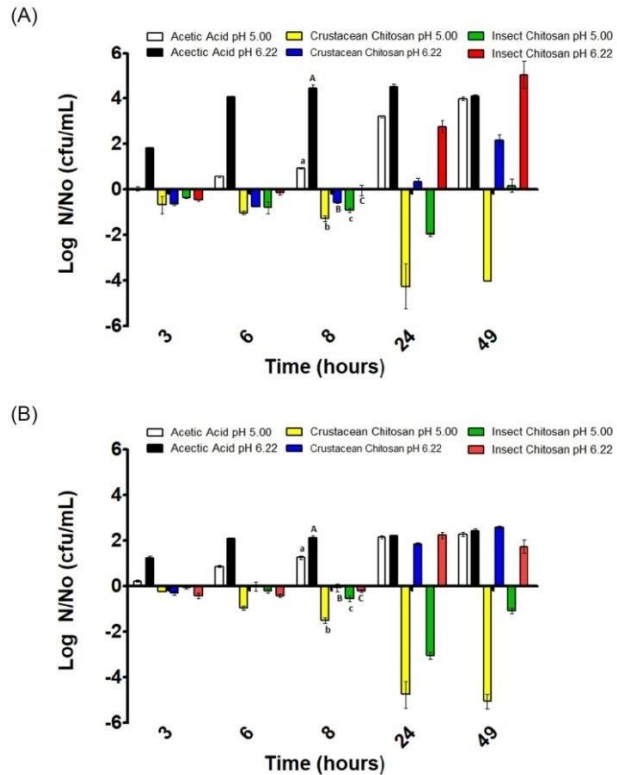
Fig 2. Variation of *L. monocytogenes* concentration in substrates inoculated with  $10^3$  CFU/mL (A) and  $10^6$  CFU/mL (B). Positive values indicate growth and negatives inactivation respect the initial inoculation value ( $N_0$ ). Different letters mean significant differences between samples of the same pH.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.g002>

Results indicated that no bactericidal effect of acetic acid at pH 6.2 took place as compared with the bactericidal effect observed at pH 5.

When *L. monocytogenes* cells were subjected to the action of crustacean chitosan in acetic acid at pH 5, a decrease in bacterial counts was observed throughout the incubation period with respect to the initial inoculum, regardless of inoculum size. Nevertheless, the inactivation effect was stronger for the inoculum size of  $10^6$  CFU/mL, and no viable cells were observed at the incubation time of 49 hours (Fig 2B).

The effect of crustacean chitosan in acetic acid at pH 6.2 can also be observed in Fig 2A and 2B. For the inoculum size of  $10^3$  CFU/mL a rapid reduction in the number of viable cells was



**Fig 3. Variation of *S. Typhimurium* concentration in substrates inoculated with  $10^8$  CFU/mL (A) and  $10^6$  CFU/mL (B).** Positive values indicate growth and negative values inactivation respect the initial inoculation value ( $N_0$ ). Different letters mean significant differences between samples of the same pH.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.g003>

observed such that at the 6 hour of incubation no viable cells were observed in the culture. This decrease in cells counts was highest than in acetic acid alone at pH 5. For the inoculum size of  $10^6$  CFU/mL, the effect was similar although there is a slight decreasing of the antimicrobial effect that produced a small growth in the number of cells at the 49 hour of incubation.

In relation to insect chitosan in acetic acid, the behavior was similar to that observed for crustacean chitosan at both pH and inoculum size values. There was a decrease in the number of cells in comparison with the initial inoculum concentration. Nevertheless, according to the results that can be seen in Fig 2A and 2B, the antimicrobial activity of the crustacean chitosan is somewhat greater than showed by the insect chitosan.

### Antimicrobial effects of chitosan solutions on *S. Typhimurium*

Results of the evolution of *S. Typhimurium* in the different substrates with initial inoculation levels of  $10^3$  CFU/mL and  $10^6$  CFU/mL are shown in Fig 3A and 3B respectively.

As can be seen in Fig 3 for both inoculum sizes, there is a cell growth in the acetic acid substrate at pH values of 5 and 6.2. This means that acetic acid at these pH values of the study does not seem to have bacteriostatic or bactericidal effect against *Salmonella Typhimurium*.

The crustacean chitosan in acetic acid at pH 5 produced a reduction of the microbial load along the incubation period of 49 hours for the two initial inoculation levels. It appears that there was a synergistic effect among acetic acid and crustacean chitosan in acetic acid at this pH level. At pH 6.2, a slight decrease followed by a latency period was observed that lasted about 8 hours followed of an increase in the number of cells at hours 24 and 49 regardless of inoculum size.

The insect chitosan in acetic acid at pH 5 and with an inoculation level of  $10^3$  CFU/mL produced a reduction in the number of viable cells at 24 hours of incubation period followed by a slight growth at 49 hours of incubation period. In the case of the inoculum level of  $10^6$  CFU/mL a reduction of 3 log cycles was observed at 24 hours of incubation, but some growth appears to take place at 49 hours of incubation period manifested as a decrease of the log reduction cycles (Fig 3B).

At pH 6.2 a latency phase was observed that lasted until 8 hours of incubation, followed by an increase in the number of cells exceeding the level of initial inoculation. This behavior was similar for both initial inocula concentrations.

### Antimicrobial effects of chitosan solutions on *E. coli*, *L. monocytogenes* and *S. Typhimurium* after 8 hours of incubation

Tables 1–3 show the concentrations of microorganisms after 8 hour of incubation period at different pH values and inoculum concentrations for each microorganism considered in the study. The time of 8 hours of incubation was considered a good check point for comparison because it was the moment at which the stationary phase was reached with acetic acid at pH 6.2 used as control for comparison purpose.

Table 1 shows the *E. coli* microbial counts after 8h of incubation in blank control, acid control and chitosan treatments. According to the table, significant differences ( $p \leq 0.05$ ) on bacterial counts were found between the blank control and the rests of substrates except for the inoculation level  $10^6$  and pH 6.2. Besides, at pH 6.2 there were significant differences ( $p \leq 0.05$ ) on counts among acetic acid, crustacean chitosan and insect chitosan substrates in the way that all chitosan treatments reduced the microbial load at pH 6.2 compared to acetic acid or

Table 1. *E. coli* behaviour after 8 hours of incubation in different substrates (mean  $\pm$  standard deviation).

Substrate	Log N/N <sub>0</sub> (CFU/mL)			
	Inoculum size $10^3$		Inoculum size $10^6$	
Control (LB pH = 7)	5.47 $\pm$ 0.075 <sup>A</sup>		3.31 $\pm$ 0.018 <sup>A</sup>	
	pH 5.0	pH 6.2	pH 5.0	pH 6.2
Acetic Acid Control	-0.11 $\pm$ 0.126 <sup>B</sup>	4.39 $\pm$ 0.041 <sup>B</sup>	-0.09 $\pm$ 0.004 <sup>B</sup>	3.34 $\pm$ 0.033 <sup>A</sup>
Crustacean chitosan	-0.12 $\pm$ 0.053 <sup>B</sup>	-3.09 $\pm$ 0.062 <sup>C</sup>	-0.06 $\pm$ 0.026 <sup>B</sup>	-3.3 $\pm$ 0.080 <sup>B</sup>
Insect chitosan	-0.11 $\pm$ 0.017 <sup>B</sup>	-1.76 $\pm$ 0.012 <sup>D</sup>	-0.07 $\pm$ 0.0236 <sup>B</sup>	-1.46 $\pm$ 0.045 <sup>C</sup>

Figures with the same letter are not significantly different by columns. Different letters indicate significant differences ( $p$  value  $\leq 0.05$ ). Negative figures mean inactivation and positive figures mean growth.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.t001>

Table 2. *Listeria monocytogenes* behaviour after 8 hours of incubation in different substrates (mean  $\pm$  standard deviation).

Substrate	Log N/N <sub>0</sub> (CFU/mL)			
	Inoculum size 10 <sup>3</sup>		Inoculum size 10 <sup>6</sup>	
	Control (TSB pH = 7)			
	4.27 $\pm$ 0.0269 <sup>A</sup>		2.98 $\pm$ 0.0170 <sup>A</sup>	
	pH 5.0	pH 6.2	pH 5.0	pH 6.2
Acetic Acid Control	-0.37 $\pm$ 0.023 <sup>B</sup>	2.96 $\pm$ 0.11 <sup>B</sup>	-0.11 $\pm$ 0.020 <sup>B</sup>	2.73 $\pm$ 0.046 <sup>B</sup>
Crustacean chitosan	-1.07 $\pm$ 0.036 <sup>C</sup>	ND	-1.85 $\pm$ 0.020 <sup>C</sup>	-3.48 $\pm$ 0.062 <sup>C</sup>
Insect chitosan	-1.28 $\pm$ 0.057 <sup>C</sup>	-1.73 $\pm$ 0.0698 <sup>C</sup>	-0.013 $\pm$ 0.049 <sup>B</sup>	-3.78 $\pm$ 0.136 <sup>D</sup>

ND = Non Detectable. Figures with the same letter are not significantly different by columns. Different letters indicate significant differences (p value $\leq$ 0.05). Negative figures mean inactivation and positive figures mean growth.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.t002>

Table 3. *Salmonella* Typhimurium behaviour after 8 hours of incubation in different substrates (mean  $\pm$  standard deviation).

Substrate	Log N/N <sub>0</sub> (CFU/mL)			
	Inoculum size 10 <sup>3</sup>		Inoculum size 10 <sup>6</sup>	
	Control (TSB pH = 7)			
	4.47 $\pm$ 0.0566 <sup>A</sup>		2.68 $\pm$ 0.05 <sup>A</sup>	
	pH 5.0	pH 6.2	pH 5.0	pH 6.2
Acetic Acid Control	0.95 $\pm$ 0.0236 <sup>B</sup>	4.42 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup>	1.29 $\pm$ 0.018 <sup>B</sup>	2.12 $\pm$ 0.046 <sup>B</sup>
Crustacean chitosan	-1.28 $\pm$ 0.045 <sup>D</sup>	-0.57 $\pm$ 0.012 <sup>C</sup>	-1.51 $\pm$ 0.0804 <sup>D</sup>	-0.02 $\pm$ 0.105 <sup>C</sup>
Insect chitosan acid	-0.90 $\pm$ 0.028 <sup>C</sup>	-0.04 $\pm$ 0.073 <sup>B</sup>	-0.55 $\pm$ 0.043 <sup>C</sup>	-0.22 $\pm$ 0.018 <sup>D</sup>

Figures with the same letter are not significantly different by columns. Different letters indicate significant differences (p value $\leq$ 0.05). Negative figures mean inactivation and positive figures mean growth.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244153.t003>

blank controls (p $\leq$ 0.05). In addition, crustacean chitosan showed a greater microbial reduction than insect chitosan.

As for *L. monocytogenes*, Table 2 shows bacterial counts after 8h of incubation in blank control and the studied substrates. Acetic acid control produced a small reduction of bacteria cells independent of inoculum size at pH 5 as compared with the blank control. Similarly to *E. coli* behaviour (Table 1), chitosan treatments at pH 6.2 showed greater *Listeria* cell reductions than at pH 5, being the maximum reduction achieved with insect chitosan at pH 6.2 for an inoculum size of 10<sup>6</sup> CFU/mL (3.78 log reductions).

Table 3 shows the *S. Typhimurium* bacterial counts after 8h of incubation in blank control and the studied substrates. As can be seen, acetic acid control media resulted in an increase of microbial counts at all pH and inoculum concentrations. Regarding *Salmonella* cells exposed to chitosan, small reductions were observed in all cases, at 8 hour of incubation, showing significant differences (p $\leq$ 0.05) among them. According to the table, those reductions in *Salmonella* cells were dependent on the source of chitosan, pH and inoculation level. In general, crustacean chitosan was more effective against *Salmonella* than insect chitosan excepting at an inoculum size of 10<sup>6</sup> CFU/mL and pH 6.2 (Table 3).

## Discussion

The effect of chitosan as an antimicrobial in agriculture and the food industry has been studied for some time ago. Allan et al. [36] already studied the effect of chitosan on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). However recently, and as a consequence of the use of minimum preservation procedures, the interest for the antimicrobial capability of this compound

obtained from chitin has been accentuated. According to previous studies carried out by other authors, the antimicrobial activity of chitosan is influenced by several extrinsic and intrinsic factors (type of chitosan, molecular weight, degree of deacetylation, solvent and concentration) as well as some environmental factors such as microorganism specie, its physiological state, pH, temperature, ionic strength, metal ions, the presence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or organic matter [37–40].

Chitosan is a biopolymer primarily commercially produced from crabs and shrimp residues. The physicochemical characteristics of chitosan influence its functional properties, which differ between species of crustaceans and methods of preparation [41]. In the present work, chitosan from crustaceans and insects have been studied. The objective was to compare the functionality as antimicrobials of commercial products of crustacean and insect chitosan. Results pointed out differences between the antimicrobial capacity of commercial crustacean chitosan and commercial insect chitosan. In general, at 49 hours of incubation period, the crustacean chitosan at pH 5.0 showed greater antimicrobial capacity than the insect chitosan at the same pH value. This behavior was mainly seen in the case of *Salmonella* where the crustacean chitosan produced more than 4 logarithmic reductions while the insect chitosan was bacteriostatic or produced around 1 logarithmic reduction. The same behavior is observed for *E. coli* although the differences in the antimicrobial activity are smaller than in the case of *Salmonella*. As indicated above, some previous studies have indicated that there may be differences between functional capacity and physical characteristics of chitosan from different crustaceans. This behavior could be more evident among chitosan from sources as diverse as crustaceans and insects.

The pH plays an important role in the antimicrobial capability of chitosan in such a way that the antimicrobial activity is inversely affected by the pH value; at low pH the chitosan seems more antimicrobial than at high pH values [38, 42–44].

Wang [45] conducted a study on the effect of different chitosan concentrations at two levels of pH 6.5 and 5.5 on different pathogenic microorganisms including *S. Typhimurium*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. The author concluded that chitosan at pH 6.5 had a very weak effect on pathogenic microorganisms; in fact, there was no inhibition of *L. monocytogenes*. At pH 5.5 there was inhibition of the microorganisms tested between 24 and 72 hours of storage at 30°C. The author concluded that chitosan acts better at pH 5.5 than at pH 6.5. More recently, Gücükoğlu [46] also studied the antibacterial activity of chitosan of different molecular weights at various pH levels (pH 4, 4.5 and 5) on *L. monocytogenes* strains. Results indicated that the pH 5 showed also the greatest bacterial reduction effect at 24 hours of the incubation period excepting for two *L. monocytogenes* strains.

In the present work two pH levels were tested at a 0.15% (w/v) concentration of chitosan. After an incubation period of 8 hours, the antimicrobial effect was higher at pH 5.00 than at pH 6.2 for *Salmonella* Typhimurium, while for *E. coli* and *Listeria* occurred the contrary, chitosan at pH 6.2 had a stronger antimicrobial effect than at pH 5.00. It appears that the effect of chitosan at both pH levels was microorganism dependant.

In our study, all microorganisms grew in the control at pH 7 reaching the stationary phase in many cases at 8 hours of the incubation period. The effect of control (acetic acid) at pH 5.0 appears to be microorganism dependent, it was bacteriostatic for *E. coli*, bactericidal for *L. monocytogenes* and in the case of *S. Typhimurium* there was a growth similar to that achieved in the control (acetic acid) at pH 6.2 after 49 hours of incubation. These results seem to indicate that the acetic acid control at pH 5.0 has an antimicrobial effect only on some microorganisms. Regarding the chitosan at the two pH levels, differences were observed regarding the control in acetic acid. Chitosan showed a clear antimicrobial activity, especially in *L. monocytogenes* at both pH values. Chitosan from both sources, crustacean and insect, at pH 5.0 were



bacteriostatic or bactericidal for the three pathogenic microorganisms studied at the 49 hours of the incubation period, while for the same period of time, growth was observed on chitosan at pH 6.2, except on *L. monocytogenes* were still chitosan at pH 6.2 had a bactericidal effect. These results are in general in agreement with those obtained by Wang [45] who indicated that all chitosan concentrations tested at pH 5.5 had a greater antimicrobial effect than at pH 6.5 excepting some chitosan concentrations against *Salmonella*. Gücükoğlu [46] also observed a general greater antimicrobial effect on the pH 5 tested on *L. monocytogenes* strains in spite of a different inoculum concentration was used in his study ( $2.0 \times 10^5$  CFU/mL) compared with our study.

According to the results, it appears that the effect of chitosan was microorganism dependent; maybe differences in the membrane of the different microorganisms could affect the antimicrobial activity of chitosan. There are some hypotheses about the antimicrobial mechanism of chitosan. The ionic interactions between positive charges of amino groups and negative bacteria surface molecules in acid conditions alter the membrane permeability leading to cellular lysis [40, 47]. Another mechanism could be the interaction with essential nutrients for bacteria [48].

The bacterial inoculum size could also affect the bactericidal effect of chitosan [49]. Those authors indicated that after 4 hours of incubation for an inoculum size of  $10^3$  cells/mL, all tested compounds proved to be bactericidal at any tested chitosan concentration; while for higher concentration of initial inoculum, 0.1% (w/v) of chitosan was only bacteriostatic; they also concluded that, independently of the inoculum level, 0.25% (w/v) of any chito-oligosaccharide mixture was sufficient to reduce the *E. coli* initial population by at least 3 log cycles. However, results of the present work, as indicated above in results section, are not conclusive regarding the effect of the inoculum size because it varied according to pH and microorganism specie; in consequence it is not possible to establish that in all cases there is a higher antimicrobial activity at one particular inoculum size.

## Conclusions

In the present study, both chitosans showed antimicrobial activity, although their effect depended on the pH and the microorganism studied. *L. monocytogenes* was the most sensitive at both pH values. Crustacean chitosan seemed more active than insect for the microorganisms studied and at the pHs tested, specially against *Salmonella*. However, more studies on the characterization of both chitosan compounds would be necessary to interpret these differences.

For the pHs studies, after 8h of incubation antimicrobial activity seems to be microorganisms' dependent; the antimicrobial effect was higher at pH 5.00 than at pH 6.2 for *Salmonella*, while for *E. coli* and *Listeria* occurred the contrary. As for inoculum size, no clear conclusions can be drawn on the antimicrobial effect of the chitosan compounds studied.

## Supporting information

**S1 Dataset. Evolution of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* counts (CFU/mL) (Log N/N<sub>0</sub>) in acetic acid, crustacean chitosan and insect chitosan treatments with different initial inoculum concentrations at pH 5 and 6.2. (XLSX)**

## Acknowledgments

The authors would like to thank Mr. Karel Clapshaw for his assistance in correcting the manuscript's English.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Antonio Martínez, Dolores Rodrigo.

**Funding acquisition:** Antonio Martínez, Dolores Rodrigo.

**Methodology:** Diana Ibañez-Peinado, Maria Ubeda-Manzanaro.

**Writing – original draft:** Diana Ibañez-Peinado.

**Writing – review & editing:** Antonio Martínez, Dolores Rodrigo.

## References

- Rajoka MSR, Mehwish HM, Wu Y, Zhao L, Arfat Y, Majeed K, et al. Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2020; 40(3):365–79. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713719> PMID: 31948287
- Rehman A, Jafari SM, Aadil RM, Assadpour E, Randhawa MA, Mahmood S. Development of active food packaging via incorporation of biopolymeric nanocarriers containing essential oils. *Trends Food Sci Technol*. 2020; 101:106–21.
- Tian B, Liu Y. Chitosan-based biomaterials: From discovery to food application. *Polym Adv Technol [Internet]*. n/a(n/a). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pat.5010>
- Hu Z. Challenges and opportunities related to the use of chitosan as food preservative. *J Appl Microbiol*. 2018; 126. <https://doi.org/10.1111/jam.14131> PMID: 30325559
- Barroso FG, de Haro C, Sánchez Muros M-J, Venegas E, Martínez-Sánchez A, Pérez-Bañón C. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquac*. 2014; 422–423:193–201.
- Kasaai MR. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr Polym*. 2008; 71(4):497–508.
- Du Y, Zhao Y, Dai S, Yang B. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2009; 10(1):103–7.
- Kulawik P, Jamróz E, Ozogul F. Chitosan role for shelf-life extension of seafood. *Environ Chem Lett*. 2019;
- Ardila N, Daigle F, Heuzey M-C, Aji A. Effect of Chitosan Physical Form on Its Antibacterial Activity Against Pathogenic Bacteria. *J Food Sci*. 2017; 82. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13635> PMID: 28140469
- Serío A, López C, Sacchetti G, Rossi C, Paparella A. Chitosan Coating Inhibits the Growth of *Listeria monocytogenes* and Extends the Shelf Life of Vacuum-Packed Pork Loins at 4 °C. *Foods*. 2018; 7.
- Brown SRB, Kozak SM, D'Amico DJ. Applications of Edible Coatings Formulated with Antimicrobials Inhibit *Listeria monocytogenes* Growth on Queso Fresco. *Front Sustain Food Syst*. 2018; 2:1.
- Gerasimenko D, Avdienko I, Bannikova G, Zueva O, Varlamov V. Antibacterial Effects of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Chitosans on Different Microorganisms. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 2004; 40:301–6. PMID: 15283332
- Ibitoye E, Idris L, Mohd Noor MH, Goh Y, Abu Bakar MZ, Jimoh A. Extraction and Physicochemical Characterization of Chitin and Chitosan Isolated from House Cricket. *Biomed Mater*. 2018; 13. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa9dde> PMID: 29182521
- Shin C-S, Kim D-Y, Shin W-S. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. *Int J Biol Macromol*. 2019 Mar; 125:72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.242> PMID: 30500507
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2019; 17(12):e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926> PMID: 32626211
- Xu X, Chen Y, Pan H, Pang Z, Li F, Peng X, et al. Genomic characterization of *Salmonella* Uzaramo for human invasive infection. *Microb Genomics*. 2020; 6. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000401> PMID: 32589568
- Ed-Dra A, Rhazi Filali F, Karraouan B, el Allaoui A, Aboukacem A, Bouchrif B. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Morocco. *Microb Pathog*. 2017; 105:340–5. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.042> PMID: 28258000

18. Liu Q, Chen W, Elbediwi M, Pan H, Wang L, Zhou C, et al. Characterization of *Salmonella* Resistome and Plasmidome in Pork Production System in Jiangsu, China. *Front Vet Sci*. 2020; 7:617. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00617> PMID: 33062654
19. Yang X, Huang J, Wu Q, Zhang J, Liu S, Guo W, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control*. 2016; 60:50–6.
20. Scallan E, Hoekstra M, Angulo F, Tauxe R, Widdowson M-A, Roy S, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17:7–15. <https://doi.org/10.3201/eid1701.p11101> PMID: 21192848
21. European Food Safety Authority (EFSA). Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The Efsa Journal*; 2007 p. 1–61. Report No.: 579.
22. Mora A, Herrera A, López C, Dahbi G, Mamani R, Pita J, et al. Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2011; 14:121–41. <https://doi.org/10.2436/201501.01.142> PMID: 22101411
23. Buchanan R, Doyle MP. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technol*. 1997; 51:69–76.
24. Painter J, Hoekstra M, Ayers T, Tauxe R, Braden C, Angulo F, et al. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19:407–15. <https://doi.org/10.3201/eid1903.111866> PMID: 23622497
25. Van de Venter T. Emerging foodborne diseases: a global responsibility. *Food Nutr Agric*. 2000; 26:4–13.
26. Farber J, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*. 1991; 55: 476–511. PMID: 1943998
27. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. 2011 p. 43–63. Report No.: 14.
28. Luber P, Crerar S, Dufour C, Farber J, Datta A, Todd E. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization—Recommendations for improved prevention and control. *Food Control*. 2011; 22: 1535–49.
29. Muñoz AB, Chaves JA, Rodríguez EC, Realpe ME. *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomédica*. 2013; 33:283–91.
30. Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Colin P, Collins J, De A. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human. *EFSA J*. 2007; 599:1–42.
31. WHO (World Health Organization) /Food and Agriculture Organization (FAO). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat Foods. *Microbiol Risk Assess Ser*. 2004;4.
32. Ibáñez-Peinado D, García-Carrión G, Martínez A, Rodrigo D. In vivo Antimicrobial Activity Assessment of a Cauliflower By-Product Extract Against *Salmonella* Typhimurium. *Front Sustain Food Syst*. 2020; 4.
33. Yilmaz Atay H. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. In: Jana S, Jana S, editors. *Functional Chitosan: Drug Delivery and Biomedical Applications* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 457–89. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15) PMID: 30990435
34. Goy RC, de Brito D, Assis OBG. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros*. 2009; 19: 241–7.
35. Sanz-Puig M, Moreira A, Torres C, Beltran J, Cunha L, Martínez A, et al. Resistance changes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium treated by High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields and assessment of virulence changes by using *Caenorhabditis elegans* as a test organism. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2019; 51:51–6.
36. Allan G. G., Altman L. C., Bensinger R. E., Ghosh D. K., Hirabayashi Y., Neogi S. Biomedical application of chitin and chitosan. In: *Chitin, chitosan and related enzymes*. Orlando, Florida: Academic Press, Inc.; 1984. p. 119–33. (Zikakis, J. P.; vol. 1).
37. Chaudhary S, Kumar S, Kumar V, Sharma R. Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. *Int J Biol Macromol*. 2020; 152:154–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.276> PMID: 32109479
38. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol*. 2002; 74(1):65–72. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00717-6) PMID: 11929171



39. Benbettaieb N, Karbowiak T, Debeaufort F. Bioactive edible films for food applications: Influence of the bioactive compounds on film structure and properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017; 59:00–00.
40. Rabea E, Badawy M, Stevens C, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 2003; 4:1457–65. <https://doi.org/10.1021/bm034130m> PMID: 14606868
41. Cho YI, No HK, Meyers SP. Physicochemical Characteristics and Functional Properties of various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Products J of Agr.I and Food Chemi*. 1998; 46(9): 3839–43.
42. Tsai GJ, Su WH. Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *J Food Prot*. 1999; 62(3): 239–43. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-62.3.239> PMID: 10090242
43. Jumaa M, Furkert FH, Müller BW. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *Eur J Pharm Biopharm*. 2002; 53(1):115–23. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(01\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(01)00191-6) PMID: 11777759
44. Raafat, D. Evaluation of the effect of chitosan on the activity of some antimicrobial agents. [Master Thesis]. [Alexandria, Egypt]: University of Alexandria; 2004.
45. Wang GH. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *J Food Prot*. 1992 Nov; 55(11):916–919. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.11.916> PMID: 31084065
46. Gücükoğlu A, Yıldırım Y, Terzi G, Erdem, Sireli. In vitro effects of chitosan on the survival of *Listeria monocytogenes*. *Vet Med*. 2016; 13:11–8.
47. Goy RC, Assis OBG. Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan. *Braz J Chem Eng*. 2014; 31:643–8.
48. Jia Z, shen D, Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydr Res*. 2001; 333(1):1–6. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00112-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00112-4) PMID: 11423105
49. Fernandes J, Tavaría F, Soares J, Ramos O, Monteiro M, Pintado M, et al. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiol*. 2008; 25:922–8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.003> PMID: 18721683



