

## ÍNDICE

<b>I. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA</b> .....	<b>3</b>
<b>II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	<b>9</b>
<b>II.1 Importancia de la inocuidad alimentaria. Patógenos alimentarios</b> .....	<b>9</b>
<b>II.2 Agroindustria, impacto medioambiental y economía circular</b> .....	<b>14</b>
<b>II.3 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 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 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 Aplicación de la Alta Presión Hidrostática (HHP) en el campo alimentario: tecnología de barreras</b> .....	<b>49</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 microbianas</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 antimicrobiana <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 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 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. Typhimurium</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</i> in vivo</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 .....	46
<b>Figura II.5.</b> Sexos de <i>C. elegans</i> : hermafrodita (XX) y macho (XO) .....	47
<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) .....	48
<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 estimada 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 (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 tripton- soja

**TSB**: caldo de tripton 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