



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos (FoodUPV)

Desarrollo de superficies funcionalizadas con antimicrobianos naturales para evitar la adherencia de bacterias presentes en aguas de baja presión de uso público

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

AUTOR/A: González Farras, Albert

Tutor/a: Pérez Esteve, Edgar

Cotutor/a externo: Moreno Trigos, M^a Yolanda

Director/a Experimental: Fornés Pérez, Alba

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

DESARROLLO DE SUPERFICIES FUNCIONALIZADAS CON ANTIMICROBIANOS NATURALES PARA EVITAR LA ADHERENCIA DE BACTERIAS PRESENTES EN AGUAS DE BAJA PRESIÓN DE USO PÚBLICO

Albert González Farràs¹, Alba Fornés Pérez², Yolanda Moreno Trigos², Édgar Pérez Esteve¹.

RESUMEN

Pese a los tratamientos de cloración empleados para mejorar la calidad microbiológica de la red de agua de baja presión utilizada en muchas ciudades para la limpieza de calles o riego de jardines, aún pueden quedar poblaciones bacterianas capaces de adherirse sobre las superficies de los sistemas de conducción de agua y formar biopelículas. El presente trabajo tiene por objetivo diseñar un sistema para reducir la formación de dichas biopelículas en superficies de sistemas de distribución mediante la funcionalización de estas con diferentes componentes de aceites esenciales (CAE). Para ello, en primer lugar, se comprobó la capacidad *in vitro* del eugenol, timol y cinamaldehído para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas aisladas de aguas de la red pública secundaria. En paralelo, se cuantificó la capacidad de adhesión de dichas cepas y se seleccionaron aquellas cinco con mayor capacidad, para estudiar en ellas el efecto de los tres CAE sobre la adhesión celular. Finalmente, los CAE se inmovilizaron covalentemente sobre placas de acero inoxidable y se determinó el efecto sobre la capacidad de adhesión celular de las cepas bacterianas. Los resultados han demostrado que con los tres CAE disminuye significativamente la formación de biopelículas. Además, la funcionalización de acero inoxidable con cinamaldehído y timol ha sido una estrategia efectiva contra la formación de biopelícula por *Kocuria rhizophila*. Estos resultados muestran el potencial de la funcionalización de superficies en contacto con el agua como estrategia sinérgica a los tratamientos actuales de cloración, con el fin de mejorar la calidad microbiológica del agua de riego.

PALABRAS CLAVE: Microbiología, biopelículas, antimicrobianos naturales, agua de riego.

RESUM

Malgrat els tractaments de cloració emprats per a millorar la qualitat microbiològica de la xarxa d'aigua de baixa pressió utilitzada en moltes ciutats per a la neteja de carrers o reg de jardins, encara poden quedar poblacions bacterianes capaces d'adherir-se sobre les superfícies dels sistemes de conducció d'aigua i formar biopel·lícules. El present treball té per objectiu

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de los Alimentos

² Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente.

dissenyar un sistema per a reduir la formació d'estes biopel·lícules en superfícies de sistemes de distribució mitjançant la funcionalització d'estes amb diferents components d'olis essencials (COE). Per a això, en primer lloc, es va comprovar la capacitat *in vitro* del eugenol, timol i cinamaldehid per a inhibir el creixement de ceps bacterians aïllats d'aigües de la xarxa pública secundària. En paral·lel, es va quantificar la capacitat d'adhesió d'estos ceps i es van seleccionar aquelles cinc amb major capacitat, per a estudiar en elles l'efecte dels tres COE sobre l'adhesió cel·lular. Finalment, els COE es van immobilitzar covalentment sobre plaques d'acer inoxidable i es va determinar l'efecte sobre la capacitat d'adhesió cel·lular dels ceps bacterians. Els resultats han demostrat que amb els tres COE disminueix significativament la formació de biopel·lícules. A més, la funcionalització d'acer inoxidable amb cinamaldehid i timol ha sigut una estratègia efectiva contra la formació de biopel·lícula per *Kocuria rhizophila*. Estos resultats mostren el potencial de la funcionalització de superfícies en contacte amb l'aigua com a estratègia sinèrgica als tractaments actuals de cloració, amb la finalitat de millorar la qualitat microbiològica de l'aigua de reg.

PARAULES CLAU: Microbiologia, biopel·lícules, antimicrobians naturals, aigua de reg.

ABSTRACT

Despite the chlorination treatments used to improve the microbiological quality of the low-pressure water network used in many cities for street cleaning or garden irrigation, bacterial populations capable of adhering to the surfaces of water conveyance systems and forming biofilms may still remain. The removal of these biofilms and the bacteria that are part of them once formed becomes more complicated. The present work aims to design a system to reduce the formation of these biofilms on the surfaces of distribution systems by functionalizing them with different essential oil components (EOC). First, the *in vitro* capacity of eugenol, thymol and cinnamaldehyde to inhibit the growth of bacterial strains isolated from secondary public water systems was tested. In parallel, the adhesion capacity of these strains was quantified and the five strains with the highest capacity were selected to study the effect of the three EOC on cell adhesion. Finally, the EOC were covalently immobilized on stainless steel plates and the effect on the cell adhesion capacity of the bacterial strains was determined. The results have shown that with all three EOC, the biofilm formation is significantly decreased. In addition, functionalization of stainless steel with cinnamaldehyde and thymol has been an effective strategy against biofilm formation by *Kocuria rhizophila*. These results show the potential of functionalization of surfaces in contact with water as a synergistic strategy to current chlorination treatments in order to improve the microbiological quality of irrigation water.

KEYWORDS: Microbiology, biofilm, natural antimicrobial, irrigation water.

1. INTRODUCCIÓN

La existencia de una red secundaria de agua a baja presión permite a muchas ciudades separar el agua de uso público del agua de consumo. Esta red es usada para el riego de parques y jardines y para la limpieza de calles. Al ser una red secundaria, se evitan problemas de carga en la red principal y, al no ser agua de consumo, la potabilización no se hace estrictamente necesaria. La consecuencia directa de esto es la fácil proliferación de bacterias patógenas que pueden adherirse a las paredes de las conducciones y generar biopelículas, inutilizando, en muchos casos, dichas tuberías. Las biopelículas causan daños estructurales y dificultan la limpieza de estas canalizaciones (Kumarasamy & Maharaj, 2015), en muchos casos forzando a reemplazar dichas tuberías.

Por otra parte, el riego de jardines o limpieza de calles se realiza mediante aspersores o difusores de agua, generando así un aerosol de microgotas contaminadas. Estas gotas suponen un riesgo para la salud pública, ya que pueden provocar enfermedades en aquellos ciudadanos que entren en contacto con las mismas. Es por esto por lo que la legislación española en los últimos años se ha vuelto más estricta en lo que concierne al tratamiento de aguas (Real Decreto 487/2022).

El tratamiento típico usado para la mejora de la calidad microbiológica de aguas es la cloración. En estos tratamientos, se añade un compuesto clorado al agua, que libera cloro libre de forma progresiva. Es un tratamiento muy económico y extendido por su facilidad y practicidad, pero no se recomienda su uso para el riego de plantas. Esto es debido a que altas concentraciones de cloro influyen negativamente en el desarrollo de ciertas especies vegetales, por lo que, se requieren alternativas para el tratamiento y desinfección de este tipo de redes de distribución (Ibrahim et al., 2015).

Los aceites esenciales son sustancias orgánicas, aromáticas y volátiles, producidas por plantas como metabolitos secundarios y usadas como mecanismo de defensa. Las propiedades concretas de cada aceite esencial dependen de la mezcla específica de estas moléculas (Sonwa, 2000), pudiendo servir como alternativa a la cloración para el tratamiento de aguas. Entre estos componentes de aceites esenciales (CAE) destacamos el eugenol, el cinamaldehído y el timol, por sus propiedades antimicrobianas (Ribes et al., 2019).

El eugenol es un hidroxifenil propeno que se encuentra principalmente en el clavo (*Syzygium aromaticum*), pero también en plantas de las familias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, y *Myristicaceae*. Entre sus propiedades destacan la de ser antioxidante y antiinflamatoria para el cuerpo humano, además de ser muy efectivo como antifúngico y un amplio rango de bacterias gram-positivas y gram-negativas. (Marchese et al., 2017)

El timol es un fenol monoterpénico que se encuentra principalmente en *Laminaceae*, y se usa en la industria alimentaria como aromatizante y conservante. Tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anestésicas, cicatrizantes, antisépticas y, sobre todo, antibacterianas y antifúngicas. (Marchese et al., 2016)

El cinamaldehído es un fenol con un aldehído insaturado, extraído de la canela (*Cinnamomum verum*) y otras plantas del género *Cinnamomum*. Usado en industria alimentaria como antifúngico natural tiene propiedades antimicrobianas destacables. Muchos derivados, de hecho, son usados como antibióticos. (Doyle & Stephens, 2019)

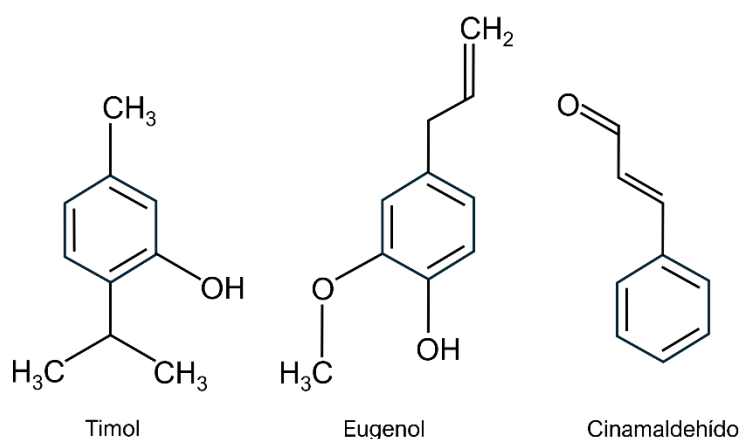


FIGURA 1. Estructura molecular de algunos componentes de aceites esenciales.

Debido a la alta volatilidad de estos compuestos, surge la necesidad de adherirlos sobre una superficie, es decir, funcionalizarla. La funcionalización se refiere al tratamiento físico y/o químico de un sólido o superficie para asignarle una determinada propiedad o función. La funcionalización permite obtener una gran cantidad de nuevos materiales avanzados, con numerosas aplicaciones sobre todo en industria, protección medioambiental, ciencia de materiales o biomedicina (Wieszcycka et al., 2021). En el caso del presente trabajo la funcionalización consistirá en la adhesión de componentes específicos de aceites esenciales sobre superficies planas de acero inoxidable, que simulan las rejillas de desgaste colocadas a lo largo de la red de agua de baja presión, donde se ha observado una alta formación de biopelículas (Pedersen, 1990).

El tratamiento de aguas mediante el uso de superficies funcionalizadas, ya ha sido descrito por autores como Ruiz-Rico et al. (2017), que usaban como partículas de sílice funcionalizadas, Gómez-Llorente et al. (2024) donde estudiaban la eliminación de virus y bacterias de aguas de consumo mediante la funcionalización de partículas de sílice con componentes de aceites esenciales, o Orhan-Yanikan et al. (2019), donde estudiaban la eliminación de biopelículas en superficies alimentarias mediante el uso de componentes de aceites esenciales.

El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de distintos componentes de aceites esenciales en la adhesión de bacterias aisladas de la red de baja presión. Para ello, se determinará el crecimiento y adhesión de las bacterias al entrar en contacto con los distintos componentes de aceites esenciales, tanto libres como fijados mediante una placa de acero, y se estudiará cómo estos afectan a la formación de biopelículas.

El presente trabajo tiene relación con los Objetivos de Desarrollo Sostenibles principalmente el 6 (Agua limpia y saneamiento), el 10 (Ciudades y comunidades sostenibles) y el 14 (Vida submarina). También y en menor medida, con el 3 (Salud y bienestar) y el 9 (Industria, innovación e infraestructura).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos.

El eugenol (99% p/p), el timol (98,5% p/p), el cinamaldehído (99% p/p), el (3-aminopropil)triétoxosilano (APTES), el paraformaldehído, la trietilamina, el boridruro de sodio y la resazurina sódica, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El metanol, el isopropanol, el diclorometano, el etanol, el ácido sulfúrico (98% H₂SO₄), el peróxido de hidrógeno (30% H₂O₂), el ácido acético glacial (98%), el n-hexano (96%), el DMSO, el agar de conteo (PCA) y el medio líquido de soja y tripsina (TSB) se obtuvieron de Scharlab (Barcelona, España). El cristal violeta (10g/L) se obtuvo de Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania). La acetona (99.5%) de LABBOX LABWARE (Barcelona, España). La solución salina tamponada y fosfatada (PBS) se obtuvo de VWR (Pensilvania, EE. UU.).

2.2. Precultivo de las bacterias aisladas.

Para este estudio se trabajó con 13 cepas de bacterias obtenidas mediante aislamiento a partir de muestras de biopelículas formadas en las tuberías de una red de baja presión, siendo las siguientes:

- Brevundimonas nasdae*.
- Acinetobacter lwoffii*.
- Brevundimonas vesicularis*.
- Massilia aurea*.
- Aminobacter sp.*
- Ensifer adhaerens*.
- Paenarthrobacter nitroguajacolicus*.
- *Staphylococcus lentus*.
- Pseudomonas Koreensis*.
- Cellulosimicrobium cellulans*.
- Priestia endophytica*.
- Microbacterium oxydans*.
- Kocuria rhizophila*.

Para obtenerlas, se rascaron 8cm² de superficie de la tubería con un hisopo en condiciones estériles y se re-suspendió el rascado en 2mL de PBS. Tras su homogeneización, se cultivó una dilución 1:100 en medio PCA y se dejó crecer durante 24 horas a 30°C. Las colonias obtenidas se re-aislaron mediante triple estría en medio PCA y, tras 24 horas a 30°C, se preservaron en criovial para futuro uso. Además, se re-suspendió otra parte en 200uL para extracción de DNA con el kit de purificación de ADN genómico GeneJET (Thermo Scientific™), usando el protocolo para bacterias gram-negativas recomendado por el fabricante. Las bacterias se caracterizaron mediante secuenciación Sanger del gen 16S rRNA usando los cebadores 27F y 1492R gracias al servicio de secuenciación IBMCP (Valencia, España). Tras la obtención de la secuencia nucleotídica, se realizó un alineamiento frente a la base de datos del NCBI mediante BLAST.

Para las distintas partes de este estudio, se hizo un cultivo previo de bacterias común a todos los protocolos que se describen en este trabajo. Partiendo de un cultivo inicial en criovial de las bacterias aisladas, se sembraron en medio sólido PCA 24 horas a 30°C. Se procedió a un re-cultivo en agar PCA 24 horas a 30°C. Por último, se estabilizaron los cultivos en medio líquido en TSB durante 24 horas a 30°C, buscando conseguir una carga bacteriana de 10⁸UFC/mL. Esto se midió mediante Nanodrop con 2µL del cultivo y leyendo la absorbancia a 600nm. En caso de que difiriera, se ajustaron las diluciones para que la carga inicial fuera siempre la misma.

2.3. Capacidad de adhesión de las bacterias.

Para el estudio de la capacidad de adhesión, se utilizó el método de [Orhan-Yanikan et al. \(2019\)](#) sin la adición de CAE. Se utilizó una placa multipocillo de 96 pocillos en la que se introdujo en cada uno 180µL de TSB junto a 20µL del precultivo líquido bacteriano. Se cultivó 24 horas a 30°C. A continuación, se eliminó el TSB de los pocillos y se lavaron con 200µL de PBS, para teñirlos posteriormente con 200µL de cristal violeta a una concentración de 1g/L durante 10 minutos. Éste se eliminó y se lavaron los pocillos tres veces con agua destilada. Por último, se añadió a cada pocillo 200µL de ácido acético al 33% para desteñir la biopelícula y se midió la absorbancia a 630nm. La capacidad de adhesión bacteriana se clasificó de acuerdo con la absorbancia medida de cada muestra con respecto a la del control negativo, siguiendo el criterio expuesto en la Tabla 1.

TABLA 1. Criterio para asignar un nivel de adhesión.

Absorbancia medida	Nivel de adhesión
Entre 0 y Control negativo	Bajo
Entre Control negativo y 2×Control negativo	Medio
Entre 2×Control negativo y 4×Control negativo	Alto
4×Control negativo o más	Muy alto

2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los diferentes compuestos de aceites esenciales.

Para el estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se utilizó el protocolo descrito por [Sarker & Kumarasamy \(2017\)](#), que se adaptó a las condiciones de este trabajo. Para cada una de las cepas objeto de estudios se mezcló en una placa de 96 pocillos medio TSB con cantidades crecientes de una disolución de cada uno de los CAE en DMSO, para favorecer su disolución de modo que estos quedasen a las siguientes concentraciones: 10mg/mL, 5mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25mg/mL, 0,612mg/mL. Previo a este ensayo se determinó la cantidad máxima de DMSO que resultaba tóxica para las células. Una vez obtenidas las diferentes concentraciones de CAE en el medio de cultivo se procedió a inocularlos con las diferentes cepas. Se realizó un control positivo y control negativo de cada una de las condiciones evaluadas (sólo TSB, TSB con DMSO en las distintas concentraciones y TSB con CAE en las distintas concentraciones). La placa, se cultivó a 30°C durante 24 horas. A continuación, se tiñieron con 30uL de resazurina al 0,25%, y se dejaron teñir durante dos horas. Una vez pasado este tiempo, se observaron pocillos con cambio de color (de azul a rosado), donde no se inhibió el crecimiento, y pocillos azules, donde sí que hubo inhibición. 10uL del medio de cultivo de los pocillos donde se había observado cambio de color, se cultivaron en PCA a 30°C durante 24 horas, para asegurar el crecimiento o inhibición. Esta metodología se ha resumido en la Figura 2.

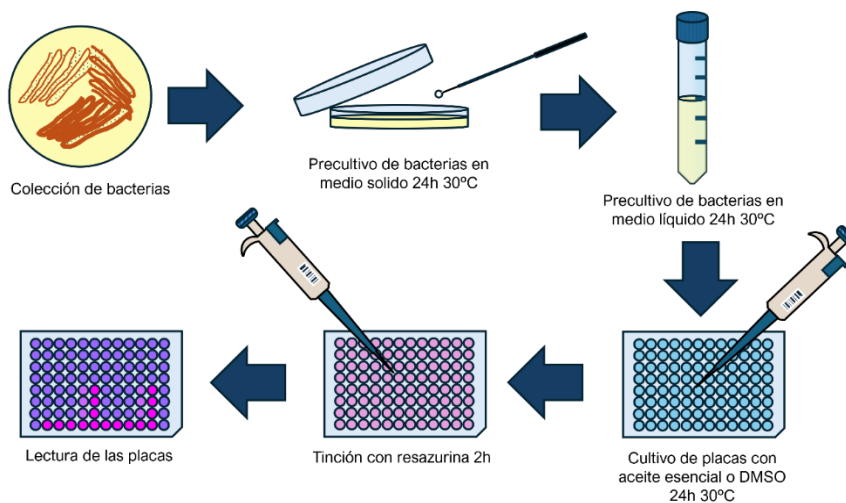


FIGURA 2. Esquema del estudio de la concentración mínima inhibitoria.

2.5. Capacidad de adhesión con presencia de aceites esenciales.

Para el estudio del efecto de los aceites esenciales libres en la formación de biopelículas, se usó el método descrito por [Orhan-Yanikan et al. \(2019\)](#).

En una placa de 96 pocillos se llenó cada uno con 200µL de una solución formada por una dilución 1:20 de cada uno de los precultivos, TSB y una dilución de aceite esencial en una concentración determinada, que se obtuvo a partir de los resultados de la CMI.

Esta placa se incubó durante 24 horas a 30°C. Durante este tiempo, las bacterias se reprodujeron y formaron o no una biopelícula sobre los distintos pocillos. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a la limpieza y tinción de las biopelículas. Para ello, se retiró el medio líquido de cultivo de cada uno de los pocillos, y se realizó un primer lavado con 200µL de PSB. A continuación, se tiñeron con 200µL de cristal violeta a una concentración 1 g/L, que se dejó durante 10 minutos. Seguidamente se retiró la solución de cristal violeta y los pocillos se limpiaron tres veces con 200µL de agua destilada. Finalmente, a cada pocillo se le añadió 200µL de ácido acético al 33% y se leyó la absorbancia a 630nm. El control negativo se realizó de la misma forma, pero sin inoculación bacteriana y el control positivo sin la adición de aceites esenciales, sustituyéndolo en ambos casos por TSB. La metodología ha quedado representada en la Figura 3.

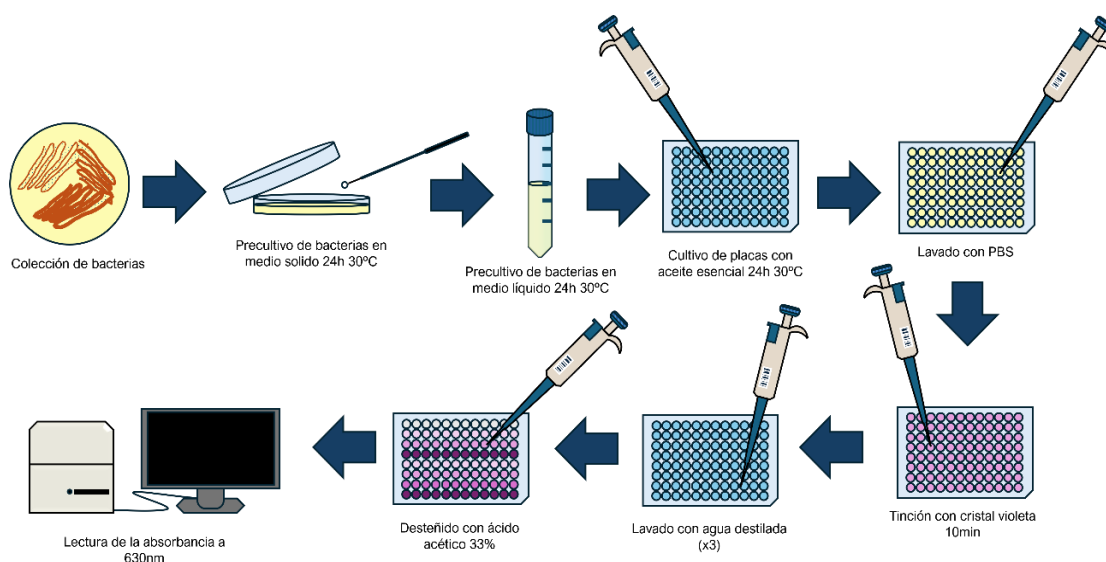


FIGURA 2. Esquema del estudio de la capacidad de adhesión con presencia de aceites esenciales.

2.6-Capacidad de adhesión en placas de acero funcionalizadas.

Para el estudio de la adhesión de bacterias sobre placas de acero inoxidable funcionalizadas con aceites esenciales, se usaron placas de acero inoxidable 316L de un tamaño de 20×20×1mm (Gimetal, Valencia). La bacteria seleccionada se obtuvo a partir de los resultados de los experimentos anteriores, buscando una bacteria con capacidad de adhesión alta y con mayor capacidad de resistencia a los CAE.

Para la funcionalización de las placas, se empezó preparándolas mediante un lijado con papel de lija de granulometría 1000, seguido de 2000, y de 5000 y un pulido con pasta de pulido. A continuación, se realizaron tres lavados con 10mL de n-hexano sumergido en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos, seguido de un lavado con 10mL de agua MiliQ durante 10 minutos en ultrasonidos y finalmente con 10mL de acetona durante 20 minutos, en ultrasonidos. Una vez pulida y limpia la placa, se activó el acero usando 10mL de solución piraña (3:1 H₂SO₄:H₂O₂) durante 10 minutos. Se repitió este paso una vez, pero sumergiéndolas en la solución piraña 5 minutos. A continuación, se hizo un lavado con 10mL de agua MiliQ para eliminar posibles restos de la solución piraña y se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente. Una vez activadas las placas, se procedió a la funcionalización.

Por un lado, para funcionalizar con trans-cinamaldehído, se siguió el proceso descrito por [Ruiz-Rico et al. \(2017\)](#). Para ello, se hizo reaccionar primero 1g del CAE con 2mL de APTES utilizando 25mL de diclorometano, con la finalidad de obtener el derivado de alcóxido capaz de unirse con las superficies de acero. La mezcla se mantuvo 2 horas en agitación continua a 400rpm a temperatura ambiente.

Esta solución se introdujo junto a una placa de acero inoxidable en un tubo Falcon de 50mL, y se mantuvo en agitación durante 24 horas en un agitador orbital.

Pasado este tiempo, se lavaron las placas dos veces con 10mL de diclorometano y otras dos con 10mL de etanol. Seguidamente, se pusieron las placas en un tubo Falcon de 50mL junto con 10mL de metanol y 200mg de borohidruro sódico (NaBH₄), durante 5 horas, con el objetivo de reducir el enlace imina formado a una amina, para estabilizar el enlace de anclaje. Se mantuvieron a temperatura ambiente en agitador orbital. Finalmente, se lavaron las placas con 10mL de agua a pH 4 con agitación manual suave, y se dejaron secar.

Por otro lado, para la funcionalización con timol y eugenol, se realizó la reacción de Mannich, que consiste en mezclar una amina primaria o secundaria (en este caso la placa con el APTES), con un aldehído (formaldehído) y un componente con un hidrogeno activo, en este caso el timol ([Cummings & Shelton, 1960](#)). En un tubo Falcon se hizo reaccionar el APTES con la placa de

acero inoxidable, formando así un enlace imina, siguiendo una proporción de 10g de acero inoxidable, por 100mL de isopropanol y 3,5mL de APTES y manteniendo la reacción en agitación durante 24 horas en el agitador orbital. A continuación, se lavaron las placas con 10mL de isopropanol cuatro veces para eliminar el APTES libre, y se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente.

A continuación, se mezclaron en un matraz de fondo redondo las placas con 2,25g de timol, con 1,12mL de formaldehído y 100mL de metanol por cada 10g de acero inoxidable. Se agitaron en reflujo a 60°C durante 24 horas. Finalmente se limpiaron las placas con 5mL de metanol cuatro veces y se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente.

Las placas funcionalizadas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido de campo para comparar el nivel de funcionalización respecto a las placas sin funcionalizar.

Una vez funcionalizadas las placas, se añadieron en un tubo Falcon de 50mL junto a 30mL de TSB y 300µL del precultivo bacteriano, y se dejaron a 30°C durante 96 horas. Tras esto, se eliminaron el medio líquido y se lavaron las placas con 15mL de PBS. Una vez limpias, se añadieron 15mL de cristal violeta a una concentración de 1 g/L y se dejaron teñir durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las placas tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de tinte, y se añadieron a tubos Falcon nuevos de 50mL junto a 10mL de ácido acético al 33%. Se agitaron y se añadieron 200µL de cada muestra a una placa multipocillo. Se realizaron también dos controles, un control negativo con la placa y el caldo de cultivo, pero sin el inóculo y un control positivo con una placa sin funcionalizar, el caldo y el inóculo. Se midió la absorbancia a 630nm en el espectrofotómetro. Esta metodología se ha resumido en la Figura 4.

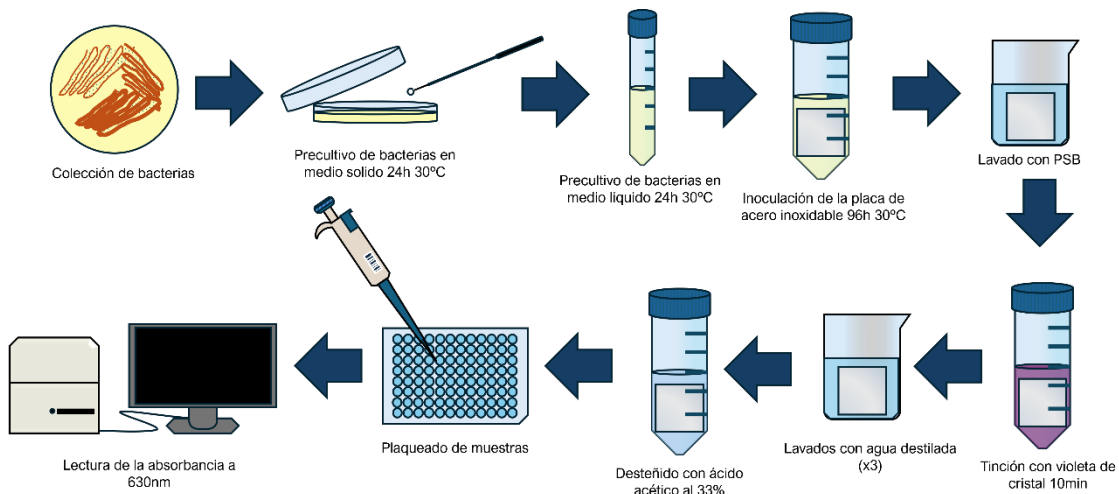


FIGURA 3. Esquema del estudio de la adhesión en placas de acero funcionalizadas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Capacidad de adhesión de las bacterias.

La Tabla 2 muestra la clasificación de las bacterias objeto de estudio según su capacidad de adhesión, baja, media, alta o muy alta.

TABLA 1. Clasificación de las bacterias en función de su capacidad de adhesión.

Baja	Media	Alta	Muy alta
- <i>Massilia aurea</i>	- <i>Brevundimonas vesicularis</i>	- <i>Brevundimonas nasdae</i>	- <i>Kocuria rhizophila</i>
- <i>Aminobacter sp.</i>	- <i>Ensifer adhaerens</i>	- <i>Acinetobacter lwoffii</i>	- <i>Staphylococcus lentus</i>
- <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	- <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i>	- <i>Pseudomonas Koreensis</i>	
- <i>Microbacterium oxydans</i>	- <i>Priestia endophytica</i>		

Teniendo en cuenta la capacidad de las diferentes cepas para formar biopelículas se seleccionaron aquellas 6 que presentaban una capacidad de adhesión alta o muy alta para las siguientes fases del estudio. Estas fueron: *Brevundimonas nasdae*, *Pseudomonas koreensis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Kocuria rhizophila* y *Staphylococcus lentus*.

Esta selección se refuerza en base a los estudios previos sobre la formación de biopelículas, [Belgini et al. \(2014\)](#) reportaron la capacidad de *Brevundimonas nasdae*, de formar biopelículas en filtros de ósmosis, [Rossi et al. \(2018\)](#) que encontraron distintas propiedades de las biopelículas formadas por *Pseudomonas koreensis* aisladas de la industria láctea. Estos resultados también concuerdan con los de [Marti et al. \(2011\)](#) donde se estudia la adhesión de distintas especies de *Acinetobacter* en distintos ambientes, entre ellas *Acinetobacter lwoffii*, [Elhariry et al. \(2018\)](#) donde se estudian métodos de eliminación de biopelículas formadas por *Kocuria rhizophila*, y [Al-Azawi \(2018\)](#), donde se detecta la formación de biopelículas de *Staphylococcus lentus* en catéteres urinarios.

3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En la Tabla 3 se presentan los valores de la CMI para cada bacteria y CAE. Con el cinamaldehído, se obtienen CMI más bajas que con timol y eugenol, reforzando estudios como el de [Doyle & Stephens \(2019\)](#), donde se expone la efectividad del cinamaldehído sobre el crecimiento bacteriano.

En el caso de *Acinetobacter lwoffii* y *Pseudomonas koreensis*, la CMI es mayor con el timol, mientras que *Staphylococcus lentus* es mayor con el eugenol. En cambio, *Kocuria rhizophila* es más sensible al timol que al cinamaldehído. *Brevundimonas nasdae* fue la bacteria con la CMI más baja en todos los CAE.

TABLA 2. Valores de CMI obtenidos.

Especie	CMI (mg/ml)		
	Eugenol	Cinamaldehído	Timol
<i>Brevundimonas nasdae</i>	<0,625	<0,625	<0,625
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	0,5	1,25
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	0,5	1,25
<i>Staphylococcus lentus</i>	1,25	0,5	0,125
<i>Kocuria rhizophila</i>	1,25	0,625	0,375

3.3. Capacidad de adhesión con presencia de aceites esenciales.

Tras haber obtenido las CMI, se determinó la capacidad de adhesión de las 6 bacterias objeto de estudio en presencia de una concentración similar a la CMI, una inferior y una superior para cada uno de los CAE. Dichos valores quedan recogidos en la Tabla 4.

TABLA 4. Concentraciones seleccionadas para medir la capacidad de adhesión.

	Concentración superior a la CMI (mg/mL)	Concentración cercana a la CMI (mg/mL)	Concentración por debajo de la CMI (mg/mL)
Cinamaldehído	1,00	0,50	0,25
Eugenol	2,00	1,00	0,50
Timol	1,00	0,50	0,25

En las gráficas de la Figura 5 se presentan los resultados de absorbancia de las distintas bacterias tras haber sido tratadas durante 24 horas con los CAE (timol, eugenol y cinamaldeído) a distintas concentraciones.

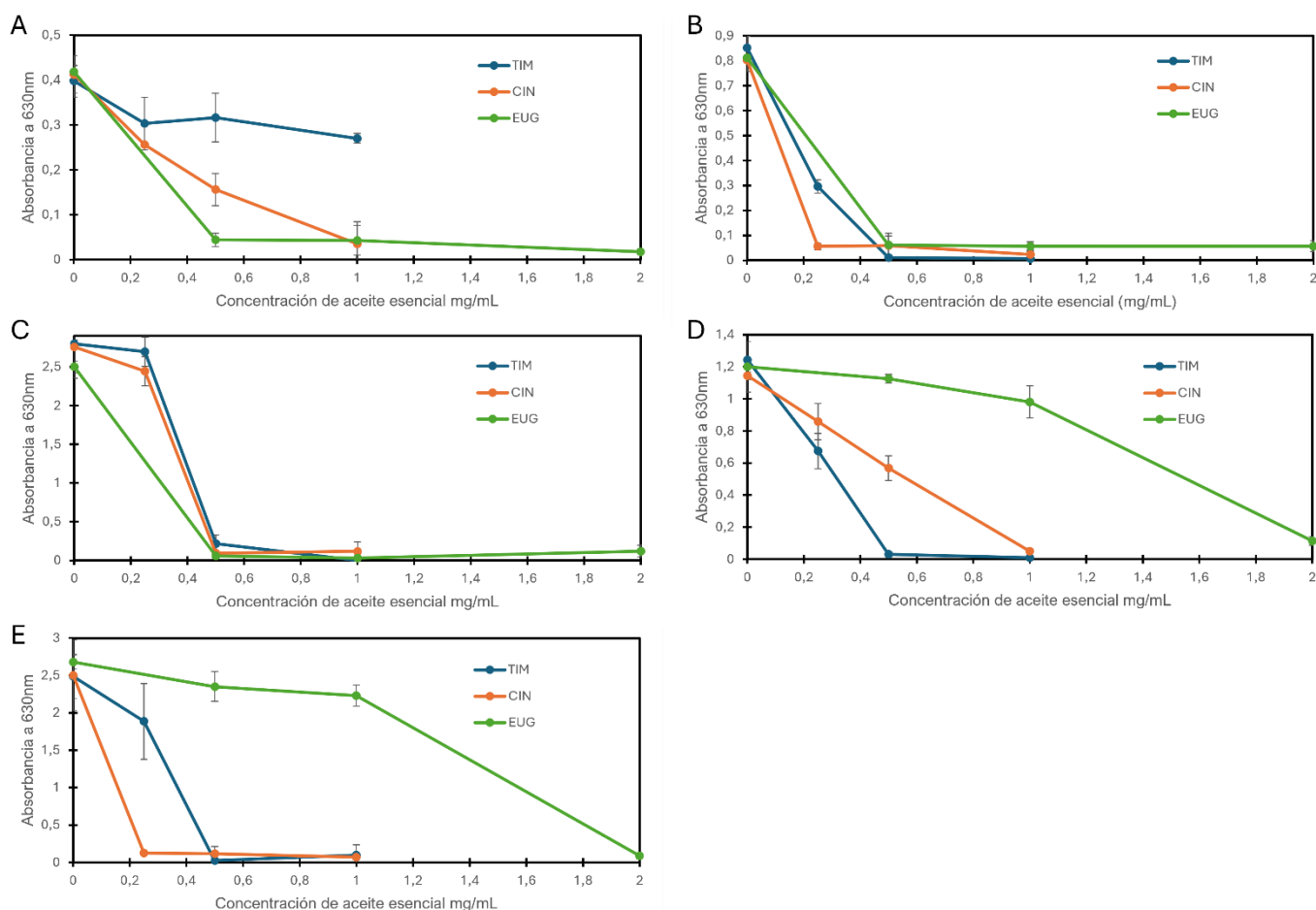


FIGURA 5. Graficas absorbancia vs concentración de aceite esencial de las distintas bacterias, siendo A *Pseudomonas koreensis*, B *Brevundimonas nasdae*, C *Acinetobacter lwoffii*, D *Kocuria rhizophila* y E *Staphylococcus lentus*, siendo TIM el timol, CIN el cinamaldeído y EUG el eugenol

El timol muestra poco efecto sobre la formación de biopelícula a las concentraciones usadas en el caso de *Pseudomonas koreensis*. En cambio, con *Brevundimonas nasdae* y *Kocuria rhizophila* se observa que la formación de biopelículas disminuye drásticamente a concentraciones de 0,25 mg/mL, desapareciendo a 0,5 mg/mL. Por último, con *Staphylococcus lentus* y *Acinetobacter lwoffii* la disminución de la adhesión ocurre más lentamente, pero desapareciendo igual a 0,5 mg/mL. Estos resultados son coherentes con lo expuesto en [Marchese et al. \(2016\)](#), donde se recogen varios experimentos sobre las propiedades antibacterianas e inhibitorias de la formación de biopelículas del timol sobre varias cepas bacterianas. En estos estudios se demuestra la efectividad del timol a concentraciones similares a las usadas en este experimento sobre el crecimiento de microorganismos.

El eugenol muestra una inhibición de la adhesión a 0,5 mg/mL en *Pseudomonas koreensis*, *Brevundimonas nasdae* y *Acinetobacter lwoffii*, mientras que *Kocuria rhizophila* y *Staphylococcus lentus* muestran una mayor resistencia al eugenol, inhibiéndose la adhesión a una concentración de 2 mg/mL. Los resultados obtenidos en este experimento son similares a los obtenidos por [Kavanaugh & Ribbeck \(2012\)](#), donde usan aceites esenciales, componentes de aceites esenciales y antibióticos para medir la inhibición de la formación de biopelículas de *Pseudomonas spp.* y de *Staphylococcus aureus*, y obtienen unos valores similares para el eugenol.

El cinamaldehído es muy efectivo en la inhibición de la adhesión en *Brevundimonas nasdae* y *Staphylococcus lentus*, no apreciándose adhesión a una concentración de 0,25 mg/mL. La adhesión disminuye lentamente en *Pseudomonas koreensis* y *Kocuria rhizophila*, perdiéndose en 1 mg/mL. En cambio, en *Acinetobacter lwoffii* se pierde a una concentración de 0,5 mg/mL. En el experimento realizado por [Kavanaugh & Ribbeck \(2012\)](#) obtienen unos datos similares para el cinamaldehído, inhibiéndose la formación de biopelículas a 0,2 % vol/vol.

3.4. Caracterización de las placas de acero funcionalizadas.

Comprobada la eficacia de los diferentes CAE para inhibir la adhesión de las cepas con mayor capacidad de adhesión, se procedió a evaluar si la funcionalización de la superficie de las placas de acero inoxidable con estos compuestos sería una estrategia efectiva para evitar la formación de biopelículas.

Previo a esta experiencia se procedió a funcionalizar y caracterizar mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) las placas, con el fin de comprobar si la funcionalización había sido correcta o no. Los resultados obtenidos se muestran en las imágenes de la Figura 6.

Como se puede observar, la orografía de las placas no tratadas consistía en una superficie muy plana con algunas grietas. Tras el proceso de pretratamiento por lijado y pulido, estas grietas desaparecen y en su lugar aparecen algunos rasguños, que se pueden apreciar en las Figuras 6C y 6D. Finalmente, tras la funcionalización con los antimicrobianos, se observa el depósito de un nuevo material (tonos grises oscuros), siendo este depósito más evidente en el caso del trans-cinamaldehído (Fig. 6B). Las diferencias en el tipo de depósito podrían deberse al tipo de reacción química utilizada, ya que en el trans-cinamaldehído no hay derivatización de la molécula previa a la inmovilización.

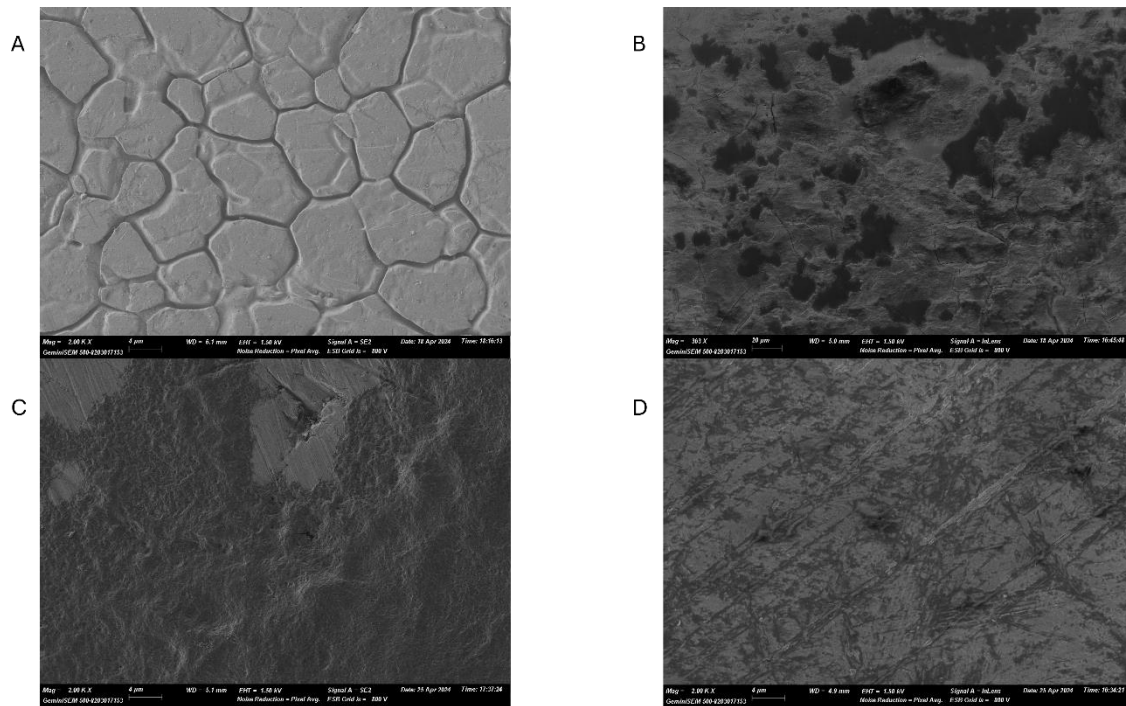


FIGURA 6. Imágenes de las placas de acero obtenidas por FESEM, siendo A placas de acero sin funcionalizar, B funcionalizada con trans-cinamaldehído, C con timol y D con eugenol.

3.5. Capacidad de adhesión en placas de acero funcionalizadas.

Tras haber determinado la actividad de los CAE evaluados, se procedió a evaluar la capacidad de adhesión en placas de acero funcionalizadas. Para ello, se selecciona la bacteria *Kocuria rhizophila*, ya que tiene una capacidad de adhesión muy alta y presenta menos sensibilidad a los CAE, lo que nos permitía saber con mayor seguridad si la funcionalización cumplía con su propósito de evitar la adhesión o no.



FIGURA 7. Porcentaje de adhesión según las distintas placas usadas, siendo funcionalizadas con TIM (timol), CIN (cinamaldehído) y EUG (eugenol).

En la Figura 7 se representa la adhesión de la bacteria sobre la superficie de acero inoxidable, marcando el 100% como la adhesión encontrada en el control positivo, es decir, en ausencia de componentes esenciales inmovilizados. Como puede observarse, en el caso de la funcionalización con timol (TIM) y del cinamaldehído (CIN), no hubo adhesión confirmando que la inmovilización de estos dos compuestos sobre las placas de acero inoxidable inhibe la adhesión de una de las cepas con mayor capacidad de adhesión. La figura también muestra cómo la funcionalización con eugenol (EUG) pese a resultar efectiva en la reducción de la adhesión de *K. rhyzophila*, no hubo una inhibición completa. Esto puede deberse al menor efecto antimicrobiano de este compuesto sobre esta cepa podría deberse a que posee menor capacidad antimicrobiana, tal y como se evidenció al determinar su CMI (sección 3.2).

La funcionalización de placas de acero inoxidable con componentes esenciales aceites esenciales disminuye la adhesión de las bacterias en estas superficies. Estos resultados se refuerzan con los obtenidos por [Ruiz-Rico et al. \(2017\)](#), que usaron partículas de sílice funcionalizadas, obteniendo valores similares.

4. CONCLUSIÓN

El uso de componentes de aceites esenciales afecta al comportamiento bacteriano, que dependiendo de la concentración del mismo tiene un efecto bactericida o inhibidor de la formación de biopelículas. De los CAE usados se ha demostrado que el cinamaldehído y el timol tienen un mayor poder de inhibición de biopelículas a una menor concentración, mientras que con eugenol estas concentraciones de inhibición son mayores. Una vez fijados sobre placas, los CAE disminuyen la capacidad de formación de biopelículas, siendo las funcionalizadas con timol y cinamaldehído las más efectivas. La aplicación de la funcionalización del acero inoxidable en redes de distribución de aguas podría por tanto mejorar la calidad microbiológica de las mismas, disminuyendo la carga bacteriana e inhibiendo la formación de biopelículas.

En agradecimiento a mi tutor Edgar, a mi cotutora Yolanda, a mi directora experimental Alba y a mi compañera de laboratorio Oumaima, gracias por haber colaborado en la elaboración de este trabajo.

A los Institutos de Ingeniería de los alimentos y del Agua y Medioambiente, por haber facilitado los recursos para la elaboración del presente trabajo, y a la UPV por la oportunidad de realizar mis estudios.

A mis amigos, por haber compartido conmigo estos años en la universidad y haberme apoyado en las ideas locas que me han surgido en los mismos, en especial a mis compañeras y amigas de la carrera, a mis compañeros de delegación de alumnos y amigos, en especial a Jaime, Ángel y Pablo.

A todas las personas que han ayudado en menor o mayor medida a la elaboración de este trabajo, en especial a Lino por apoyarme y sacar este documento adelante.

A mi familia, por haberme aguantado en las buenas y en las malas épocas, sobre todo a mis padres y abuelos, por apoyarme aun sin entender de que va el trabajo.

A todos, gracias.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Azawi, I. H., Al-Hamadani, A. H., & Hasson, S. O. (2018). Association between biofilm formation and susceptibility to antibiotics in staphylococcus lentus isolated from urinary catheterized patients. *Nano Biomed. Eng*, 10(2), 97-103.
- Belgini, D.R.B., Dias, R.S., Siqueira, V.M. *et al.* Culturable bacterial diversity from a feed water of a reverse osmosis system, evaluation of biofilm formation and biocontrol using phages. *World J Microbiol Biotechnol* **30**, 2689–2700 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1693-1>
- Choudhary, M., Shrivastava, R., & Vashistt, J. (2022). Eugenol and geraniol impede Csu-pilus assembly and evades multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* biofilms: In-vitro and in-silico evidence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 636, 10-17.
- Cummings, T. F., & Shelton, J. R. (1960). Mannich reaction mechanisms. *The Journal of Organic Chemistry*, 25(3), 419-423.
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139, 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Elhariry, H., Gado, E., El-Deeb, B., & Altalhi, A. (2018). Antibiofilm potential of biogenic silver nanoparticles against *Kocuria rosea* And *Kocuria rhizophila*. *Microbiology*, 87, 9-20.
- Gómez-Llorente, H., Pérez-Esteve, É., Barat, J. M., Fernández-Segovia, I., & Myrmel, M. (2024). Tulane virus disinfection of drinking water by using natural antimicrobials immobilised on silica particles. *Journal of Water Process Engineering*, 59, 104999. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.104999>
- Ibrahim, S., Kiran, A., Rashid, M., Yamin, S., Zarlish, A., Munir, S., & Tehreem, R. (2015). The efficacy of chlorinated water used for irrigation purpose on plant initial growth. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(4), 17-19.
- Kavanaugh, N. L., & Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 78(11), 4057–4061. <https://doi.org/10.1128/AEM.07499-11>
- Kumarasamy, M. V., & Maharaj, P. (2015). The Effect of Biofilm Growth on Wall Shear Stress in Drinking Water PVC Pipes. *Polish Journal Of Environmental Studies*, 24(6), 2479-2483. <https://doi.org/10.15244/pjoes/58592>
- Łysakowska, M., Denys, A., & Sienkiewicz, M. (2011). The activity of thyme essential oil against *Acinetobacter* spp. *Open Life Sciences*, 6(3), 405-413. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0008-x>
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Ajami, M., ... Nabavi, S. M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 668–689. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Martí, S., Rodríguez-Baño, J., Catel-Ferreira, M., Jouenne, T., Vila, J., Seifert, H., & Dé, E. (2011). Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC research notes*, 4, 1-4.
- Orhan-Yanikan, E., da Silva-Janeiro, S., Ruiz-Rico, M., Jiménez-Belenguer, A. I., Ayhan, K., & Barat, J. M. (2019). Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains

- present in the meat industry. *Food Control*, 101, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.035>
- Pedersen, K. (1990). Biofilm development on stainless steel and pvc surfaces in drinking water. *Water Research*, 24(2), 239-243. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90109-j](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90109-j)
- Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis. Boletín Oficial del Estado, núm. 148, 86158 a 86212. <https://www.boe.es/eli/es/rd/2022/06/21/487>
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., & Barat, J. M. (2019). Enhancing the antimicrobial activity of eugenol, carvacrol and vanillin immobilised on silica supports against *Escherichia coli* or *Zygosaccharomyces rouxii* in fruit juices by their binary combinations. *LWT*, 113, 108326. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108326>
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., Cenci-Goga, B. T., Lista, F., Fillo, S., & Paparella, A. (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.018>
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.118>
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Sonwa, M. M. (2000). Isolation and structure elucidation of essential oil constituents. *Comparative Study of the Oils of Cyperus alopecuroides, Cyperus papyrus, and Cyperus rotundus [Ph. D. Thesis]*. University of Hamburg, Hamburg.
- Wieszczycka, K., Staszak, K., Woźniak-Budych, M. J., Litowczenko, J., Maciejewska, B. M., & Jurga, S. (2021). Surface functionalization – The way for advanced applications of smart materials. *Coordination Chemistry Reviews*, 436, 213846. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213846>