



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



iata

Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE VIRULENCIA EN *SALMONELLA* *TYPHIMURIUM* TRATADA CON EXTRACTO DE COLIFLOR MEDIANTE EL USO DE *CAENORHABDITIS* *ELEGANS* COMO ORGANISMO MODELO

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

ALUMNO/A: ALEJANDRA ARANA LOZANO

TUTOR ACADEMICO: ANTONIO MARTÍNEZ LÓPEZ
COTUTORA : MARÍA DOLORES RODRIGO ALIAGA
DIRECTORA EXPERIMENTAL: MARIA SANZ PUIG

Curso Académico:2015-2016

VALENCIA, ENERO 2016

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE VIRULENCIA EN *SALMONELLA* TYPHIMURIUM TRATADA CON EXTRACTO DE COLIFLOR MEDIANTE EL USO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS* COMO ORGANISMO MODELO

Alejandra Arana Lozano, Antonio Martínez López¹, María Dolores Rodrigo Aliaga², Maria Sanz Puig²

RESUMEN

Salmonella enterica serovar Typhimurium es un patógeno que causa una de las principales enfermedades de transmisión alimentaria. Se puede encontrar en gran cantidad de alimentos pero sobretodo en huevos y en carnes crudas. Para garantizar la inocuidad de los alimentos, se aplican tecnologías de conservación, entre las que destaca el tratamiento con antimicrobianos naturales. Esta tecnología ofrece una alternativa a métodos tradicionales de conservación como son los tratamientos térmicos. Pero el uso de estos tratamientos no convencionales puede generar cambios y/o adaptaciones en los microorganismos y no exclusivamente la muerte bacteriana. En el presente trabajo se evalúa la posible aparición de adaptaciones, resistencias o cambios de virulencia producidos tras el uso de un antimicrobiano natural, utilizando como modelo al *Caenorhabditis elegans*. Para ello se somete a una población de *S. Typhimurium* a un tratamiento con una infusión de subproducto de coliflor repetidamente (hasta 3 veces) y posteriormente se alimenta a una población de *C. elegans* con el microorganismo tratado y sin tratar. Los resultados obtenidos sugieren un aumento de la resistencia de *S. Typhimurium* frente al uso del subproducto de la coliflor como antimicrobiano natural, cuando este es empleado de forma repetida. Además, se observa que en las poblaciones de *C. elegans* alimentadas con las cepas de *S. Typhimurium* tratadas la esperanza de vida, la puesta de huevos y la movilidad, son mayores en comparación con las poblaciones de *C. elegans* alimentadas con *S. Typhimurium* no tratada.

RESUM

Salmonella enterica serovar Typhimurium és un patògen que causa una de les principals malalties de transmissió alimentaria. Pot trobar-se en gran quantitat d'aliments però, sobretot en ous i carns crues. Per a garantir la

¹ Antonio Martínez López, Universitat Politècnica de València, Campus de Vera, Camino de Vera s/n 46022, Valencia, España.

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Calle Catedrático Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, España.



innocuitat dels aliments, s'apliquen tecnologies de conservació, entre les que destaquen el tractament amb antimicrobians naturals. Aquesta tecnologia ofereix una alternativa als mètodes tradicionals de conservació com són els tractaments tèrmics. No obstant, l'ús d'estos tractaments no convencionals pot generar canvis i/o adaptacions en els microorganismes i no exclusivament la mort bacteriana. En el present treball s'avalua la possible aparició d'adaptacions, resistències o canvis de virulència produïts per l'ús d'un antimicrobià natural, utilitzant com a model al *Caenorhabditis elegans*. Per això se sotmet a una població de *S. Typhimurium* a un tractament amb una infusió de subproducte de coliflor com a antimicrobià natural repetidament (fins a 3 vegades) i posteriorment s'alimenta a una població de *C. elegans* amb el microorganisme tractat i sense tractar. Els resultats obtinguts suggerixen un augment de la resistència de *S. Typhimurium* contra l'ús del subproducte de la coliflor empleat com a antimicrobià, quan es emplea de manera repetida. A més s'observa que en les poblacions de *C. elegans* alimentades amb les soques de *S. Typhimurium* tractades, l'esperança de vida, la posada d'ous i la mobilitat són majors en comparació amb les poblacions de *C. elegans* alimentades amb *S. Typhimurium* no tractada.

ABSTRACT

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a pathogen that causes one of the major foodborne diseases. It is found in many food and food products, but especially in eggs and raw meats. To ensure food safety, preservation technologies are applied against this pathogen, like the use of natural antimicrobial treatments. This technology offers an alternative to traditional methods of preservation such as heat treatments. But the use of these unconventional treatments can generate changes or adaptations and not only cause bacterial death. This paper evaluates the possible appearance of adaptations, resistances or virulence changes caused by the use of antimicrobial treatments, using *Caenorhabditis elegans* as a model. A population of *S. Typhimurium* is subjected to a treatment with an infusion of cauliflower by-product repeatedly (up to 3 times) and subsequently fed to a population of *C. elegans* with the microorganism treated and untreated. The results suggest an increased resistance of *S. Typhimurium* against the repeated use of cauliflower by-product infusion as natural antimicrobial. In addition, it is noted that life span, egg laying and mobility are higher in populations of *C. elegans* fed with the treated *S. Typhimurium* compared with the populations of *C. elegans* fed with the untreated *S. Typhimurium*.

PALABRAS CLAVE: Conservación, nuevas tecnologías, antimicrobianos naturales, cambios de virulencia, resistencia, *S. Typhimurium*, *C. elegans*.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica serovar Typhimurium es un bacilo gram negativo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo y no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata de una bacteria móvil y termolábil (su temperatura óptima de crecimiento es de 37 a 40°C) que se encuentra comúnmente en los intestinos de aves y mamíferos sanos. Es la principal causa de enfermedad alimentaria transmisible en diversos países. Según la EFSA (European Food Safety Authority) es un patógeno emergente del cual se notifican alrededor de 100.000 casos cada año en la Unión Europea (UE) (EFSA, 2014). La salmonelosis es una enfermedad cuyos síntomas incluyen fiebre, diarrea, dolor abdominal y espasmos abdominales y suele durar de 4 a 7 días. La transmisión a los seres humanos se produce por el consumo de alimentos contaminados procedentes de animales infectados (huevos y carne de pollo, pavos y cerdos) o a través de alimentos contaminados de forma cruzada, como frutas y vegetales (FDA, 2012).

Para proteger a los consumidores de estas infecciones alimentarias, la UE ha adoptado un enfoque integrado de seguridad alimentaria, desde la granja hasta la mesa (“from the farm to the fork”). El enfoque consiste tanto en la evaluación como en la gestión de riesgos a lo largo de todas las etapas de la cadena alimentaria y se centra en la comunicación eficaz de este tipo de riesgos. Gracias a la actuación conjunta de la UE y de los Estados Miembros han disminuido los casos humanos de salmonelosis en un periodo de siete años (de 2008 hasta 2014), produciéndose una reducción de hasta el 21,7 % de los casos de 2013 a 2014 (EFSA, 2014). Además las notificaciones de los casos durante el año 2014 aumentaron un 15,3% con respecto a 2013 (EFSA, 2015). Aun así, en febrero de 2015 la EFSA y el ECDC (Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades) publicaron un informe en el que *Salmonella* y *Campylobacter* mostraban niveles significativos de resistencia a los antibióticos en seres humanos y animales. Es por ello que desde diferentes organizaciones y empresas se están desarrollando investigaciones para analizar en qué medida las nuevas tecnologías de inactivación microbiana (tecnologías no térmicas), pueden suponer un reto en materia de inocuidad alimentaria debido a la posible adaptación de los microorganismos.

La creciente demanda de productos ecológicos y mínimamente procesados (alimentos crudos y frescos) así como la relación existente entre conservantes químicos y alergias, intoxicaciones alimentarias e incluso enfermedades neoplásicas, también ha generado en la industria alimentaria una búsqueda de alternativas de conservación que alteren, en menor medida, las características organolépticas de los alimentos. La principal razón de este interés por parte de los consumidores es la salud. La búsqueda se centra en alternativas que garanticen la misma inocuidad de los alimentos que los tratamientos térmicos tradicionales sin alterar sus características organolépticas. Nace así la aplicación de nuevas tecnologías



no térmicas de conservación como son las altas presiones hidrostáticas, la aplicación de ozono, la radiación con ultrasonidos y la utilización de aceites esenciales y sustancias naturales como son los antimicrobianos (Wilson et al., 2011; Hu et al., 2004).

Las empresas del sector de la agroalimentación generan grandes cantidades de residuos alimentarios en todo el planeta. Su eliminación suele suponer un gran coste para los productores y además suele provocar efectos nocivos sobre el medio ambiente. Por ello, muchas de las investigaciones de los últimos años se basan en la reutilización de los subproductos agrarios para ser utilizados como productos primarios, un ejemplo de esto es la obtención de antimicrobianos naturales (Sung et al., 2007; Sanz-Puig, 2014). Los residuos vegetales suelen ser los más empleados ya que son los que más sustancias bioactivas presentan. Estas sustancias se caracterizan por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, virus y hongos por lo que se pueden aplicar como conservantes naturales en ingeniería alimentaria. Constituyen así una nueva forma de garantizar alimentos seguros, evitando la alteración de las propiedades organolépticas de los mismos y que además no resultan nocivos para los consumidores. Dentro de estos antimicrobianos naturales destacamos los derivados de la familia *Brassicaceae*, al que pertenecen hortalizas como el brócoli o la coliflor. La coliflor es una verdura rica en glucosinolatos, sustancia de la que derivan compuestos aromáticos y bioactivos como los isotiocianatos (ITCs), tiocianatos, indoles y polifenoles. Es a estas sustancias a quienes se les atribuye efectos inhibidores del crecimiento de microorganismos. Numerosas investigaciones han demostrado el efecto antimicrobiano de los ITCs en diferentes alimentos, siendo las bacterias Gram negativas las más sensibles ante estos compuestos (Wilson, A. E. et al, 2011).

Este estudio se centra en la validación de la actividad de compuestos antimicrobianos provenientes de subproductos de la coliflor, evaluando los cambios de virulencia y de resistencia que podrían producirse en una población bacteriana de *S. Typhimurium* utilizando como organismo modelo al *Caenorhabditis elegans*. Para ello se han realizado tres ensayos en los que se evalúa la esperanza de vida, la puesta de huevos y la movilidad de este nematodo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la cepa de *S. Typhimurium*

En el estudio se ha empleado un cultivo puro liofilizado de *S. Typhimurium* proveniente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 443). Se trata de una cepa de *S. Typhimurium*. Para reactivarlo se disuelve el líofilo en 0,2-0,3 mL de medio de cultivo TSB (Tryptic Soy Broth, Scharlab chemie, Barcelona). Una vez rehidratada, se vierte sobre 500 mL de medio TSB y se deja reposar 30 minutos a 37° C. Pasados los 30 minutos se deja en agitación a 200 rpm durante 16 horas, hasta alcanzar la fase estacionaria. Tras las 16 horas, se dividen los 500 mL en 2 botes de 250 mL y se centrifugan a 5000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el precipitado de cada bote se vuelve a disolver en 100 mL de TSB. Se vuelven a centrifugar a 5000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Se quita el sobrenadante de ambos tubos y ambos precipitados se vuelven a disolver en 50 mL de TSB. Por último se distribuyen en 50 viales de 2 mL cada uno y se les añade 1 mL de Glicerol diluido al 20 % con TSB. Estos viales presentan una concentración final de 10⁹ UFC/mL y corresponden con los viales madre de *S. Typhimurium*.

Preparación de la infusión de coliflor

Se introducen 10 g de subproducto de Coliflor (cedido por la empresa TRASA S.L.) en 100 mL de agua de peptona (Scharlab chemie, Barcelona) estéril en ebullición. Se deja reposar 30 minutos y se centrifuga a 4000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Posteriormente se realiza una filtración mediante el uso de 3 filtros con diferentes diámetros de poro; primero uno de 11 micras, seguido de uno de 2,5 micras y por último se utiliza un filtro de 0,45 micras con jeringa para esterilizar la muestra. Una vez filtrada la infusión se toman 15 mL de la misma y se añaden a 15 mL de agua de peptona estéril. De esta forma obtenemos 30 mL de una infusión de coliflor al 5%.

Exposición de *S. Typhimurium* a la infusión del subproducto de coliflor

En el estudio se somete a una población inicial de *S. Typhimurium* a tres tratamientos seriados de la infusión del subproducto de coliflor al 5%.

Se parte de un vial madre de *S. Typhimurium* con una población de 10⁹ UFC/mL. Los 2 mL que contiene este vial se añaden a 18 mL de agua de peptona estéril y de estos 20 mL se toma 1 mL y se añade a 30 mL de la infusión de coliflor al 5%, obteniendo así una concentración bacteriana de 10⁷ UFC/mL. En este punto del estudio, se toman 0,1 mL de la infusión con la población bacteriana y se realiza una siembra por inmersión en placa realizando las correspondientes diluciones seriadas para comprobar la concentración bacteriana (concentración pre-exposición 1).



El resto de la infusión con la población de *S. Typhimurium* se deja incubar durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación se centrifuga la muestra 2 veces a 4000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Se vuelve a suspender en 10 mL de TSB y se vuelve a realizar una siembra de las diluciones seriadas para valorar el posible incremento de la concentración bacteriana (concentración bacteriana post-exposición 1). De los 10 mL de la muestra se toma 1 mL y se añade a 500 mL de TSB con una concentración de levadura al 5 % y se deja incubar en agitación a 37°C durante 15 horas. Este paso permite un crecimiento exponencial de la población (fase estacionaria) que alcanzará una concentración de 10^9 UFC/mL. Pasadas las 15 horas se distribuye la muestra en diez tubos tipo falcon para centrifugarlos a 4000 rpm y a 4°C durante 15 minutos. Nueve de los tubos se conservan a -80°C para guardar la población expuesta a la infusión. El tubo restante se vuelve a suspender en 10 mL de TSB. De estos 10 mL se toman 100 µL y se añaden a 900 µL de agua de peptona. Obteniendo así 1 mL de población de 10^6 UFC/mL expuesta una vez a la infusión de coliflor. Este mililitro se añadirá a otros 30 mL de infusión de coliflor al 5 % para repetir el proceso de exposición. El proceso se repite hasta 3 veces correspondiendo así a 3 tratamientos consecutivos y se realizan 4 repeticiones de cada tratamiento. Posteriormente se analizan los datos obtenidos de los recuentos de colonias provenientes de las diluciones seriadas que se realizan antes y después de cada tratamiento con la infusión y se llevan a cabo utilizando un contador de colonias automático (IUL COUNTERMAT FLASH 4.2) En la figura 1 puede verse un esquema de todo el procedimiento realizado.

Gracias a estas exposiciones obtenemos cuatro poblaciones distintas de *S. Typhimurium*: una sin tratar y tres correspondientes a cada tratamiento. De estas poblaciones se escogen tres (*S. Typhimurium* sin tratar, *S. Typhimurium* tratada una vez y *S. Typhimurium* tratada tres veces consecutivas) y con ellas se alimenta al nematodo para realizar cada ensayo.

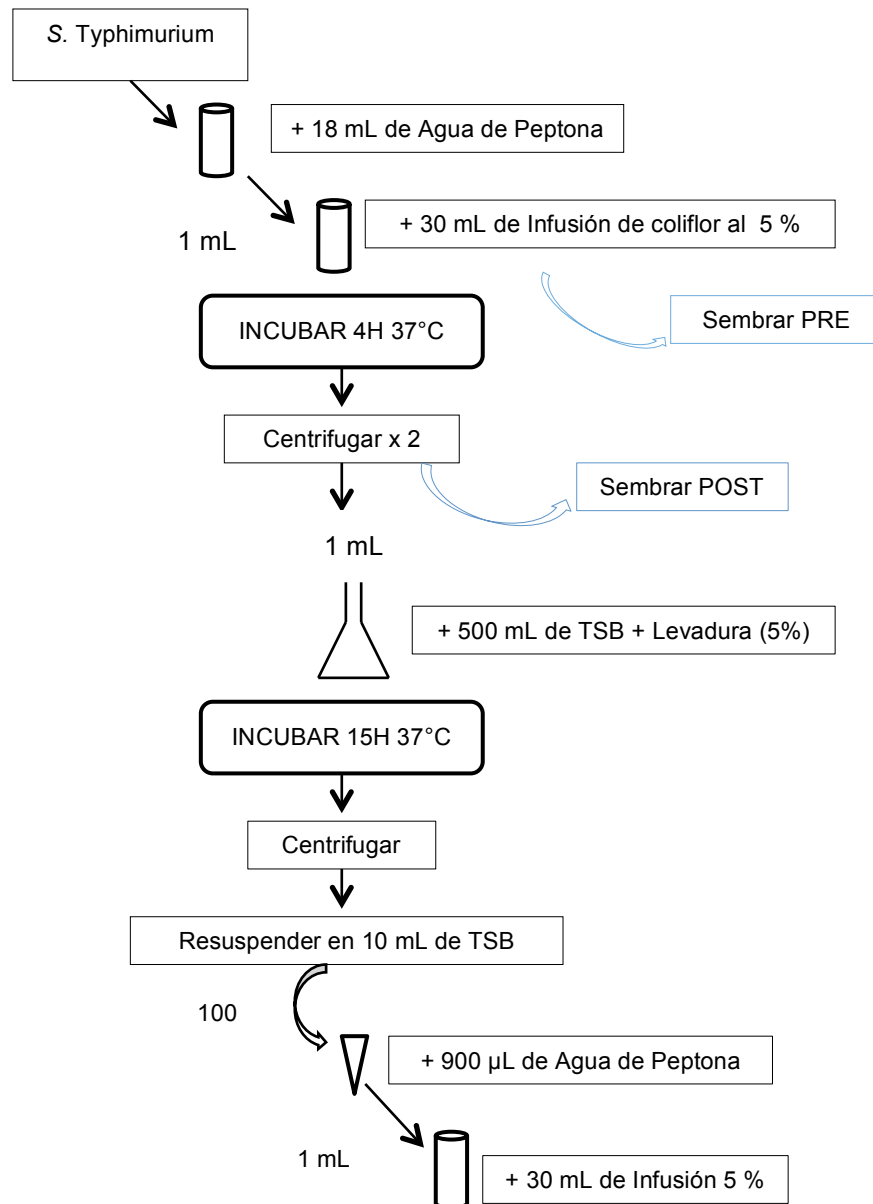


Figura 1. Esquema de la exposición de *S. Typhimurium* a la infusión del subproducto de coliflor.

Mantenimiento de *C. elegans*

C. elegans es un nematodo de pequeño tamaño (1 mm de largo en su estadio adulto) ampliamente utilizado en biología desde hace décadas (Lavigne et al., 2006). Esto se debe a varias de sus características fisiológicas: su transparencia, su condición hermafrodita, su desarrollada definición del sistema digestivo y nervioso, su ciclo de vida reducido y su fácil mantenimiento en el laboratorio. El stock empleado de *C. elegans*, procedente del College of Biological Sciences, Minnesota University, USA se

ha incubado en placas con un medio de cultivo MNG (Nematode growth media). Este medio se dispone en placas petri de 55 mm de diámetro y una vez solidificado se siembra en su superficie un césped de *Escherichia coli* OP50; principal alimento del nematodo (Darby, C., 2005).

Para el estudio lo primero es obtener una población sincronizada de *C. elegans*. Para ello se ponen adultos del mismo tamaño en placas con medio MNG y su alimento *E. coli* OP50 y se espera a que pongan huevos. Se separan los huevos puestos el mismo día y se dejan crecer en condiciones óptimas (20°C) hasta alcanzar el estadio adulto.

En la siguiente imagen (figura 2) puede verse el ciclo de vida completo del nematodo.

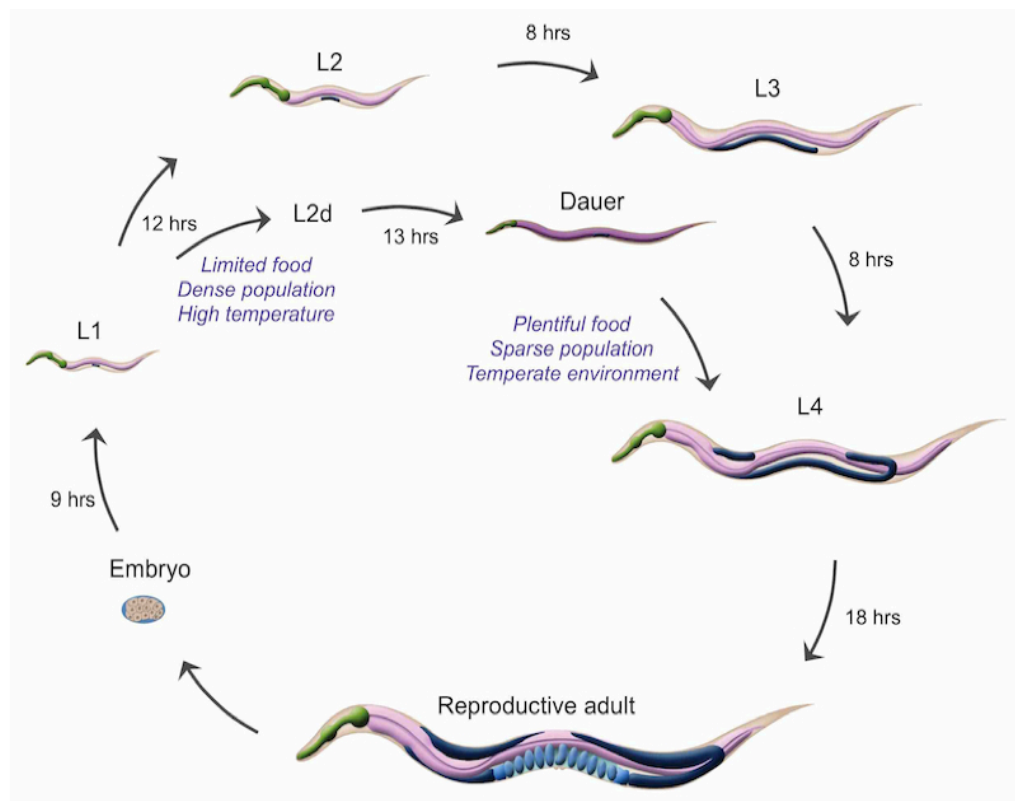


Figura 2. Esquema del ciclo de vida completo *C. elegans*.

Para mantener las condiciones óptimas necesarias para el estudio y que éstas tengan el mínimo efecto en la longevidad, los nematodos se transfieren cada 48 horas a placas nuevas con un césped de *E. coli* OP50. Esto ayuda además a mantener la población de estudio controlada, puesto que los nematodos descendientes pueden llegar a alcanzar un tamaño similar a los adultos. Para el correcto manejo del nematodo ha sido necesario el uso de técnicas de microscopía. En cada ensayo se ha empleado un microscopio estereoscópico binocular (COMECTA S.A.) que ha permitido la fácil visualización y manipulación de los nematodos.

Preparación de la cepa *E. coli* OP50

La gran mayoría cepas de *C. elegans* se mantienen en un césped de *E. coli* OP50. Se trata de un microorganismo auxótrofo cuyo crecimiento está limitado a placas MNG. En primer lugar se preparan las placas de MNG y posteriormente se siembra el césped de *E. coli* disuelto en un medio LB (Luria – Bertani, Scharlab chemie, Barcelona). Para que la siembra de los diferentes céspedes sea equitativa se mide la absorbancia mediante un espectrofotómetro (Lan Óptica Modelo PG1800, LABOLAN, España).

Exposición de *C. elegans* a diferentes poblaciones microbianas

En el estudio se evaluó la esperanza de vida, la movilidad y la puesta de huevos del organismo modelo, para estudiar los posibles cambios de virulencia producidos en las poblaciones tratadas con el antimicrobiano.

Para el estudio de la esperanza de vida se transfirieron 10 nematodos por placa hasta alcanzar un total de 25 placas, obteniendo una población $n=250$ para cada alimento. Cada 48 horas se contabilizan los nematodos muertos y vivos y estos últimos se trasladan a placas con césped nuevo. Este procedimiento se repite hasta la muerte de los 10 nematodos.

Posteriormente, para el estudio de la movilidad, se toman 25 placas con 1 nematodo en cada una, obteniendo una población $n=25$ para cada alimento. En la misma placa se contabiliza el número de movimientos que hace el nematodo en 10 segundos. Cada 48 horas se cambia al nematodo de placa hasta que finalmente muere, siguiendo así toda su trayectoria.

Del mismo modo se evalúa la puesta de huevos. Se toman 25 placas con 1 nematodo en cada una, obteniendo así una población $n=25$ para cada alimento. Cada dos días se contabilizan los huevos que cada uno pone y posteriormente se trasladan a otra placa. Este procedimiento se repite hasta la muerte del nematodo.

En total se emplearon 300 nematodos para el estudio de cada alimento (*S. Typhimurium* sin tratar, *S. Typhimurium* 1 y *S. Typhimurium* 3). Cada ensayo se realiza con una población sincronizada de *C. elegans* (estadio adulto) manteniéndolas a una temperatura constante de 20°C.

En la figura 3 se puede observar una imagen en detalle del nematodo.



Figura 3. Fotografía de *C. elegans* tomada en el IATA-CSIC mediante el microscopio Nikon Eclipse 9i.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó la media y la desviación típica de los recuentos de *S. Typhimurium* tratada con el extracto de coliflor y de los diferentes elementos de estudio de *C. elegans*. Los análisis estadísticos se realizaron con STATGRAPHICS CENTURION XII mediante el análisis de la varianza ANOVA. Se trata de un método de estadística aplicada con un estimador que tiene en cuenta la censura, para estudiar el daño producido en *S. Typhimurium* y los procesos relacionados con la muerte del organismo tipo. Para la estimación de las curvas de supervivencia y de riesgo se empleó además el método Kaplan-Meier, trazándose tablas de intervalos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la resistencia de *S. Typhimurium* al tratamiento seriado con infusión de subproducto de Coliflor

La primera parte del estudio se centra en la evaluación de la resistencia desarrollada por *S. Typhimurium* frente al tratamiento antimicrobiano, mediante la exposición a una infusión de subproducto de coliflor al 5 % de forma repetida hasta alcanzar una población microbiana resistente para su posterior administración al nematodo. Para ello se expone a la población bacteriana a tres tratamientos seriados con la infusión de subproducto de coliflor.

La figura 4 muestra los cambios en los ciclos logarítmicos que se producen tras cada tratamiento (4 horas a 37°C). Se puede observar una reducción significativa de 1,04 ciclos logarítmicos, tras el primer tratamiento. En el segundo tratamiento no se observa una reducción, sino un incremento de 0,282 ciclos logarítmicos. En el tercer tratamiento también se observa un incremento de la población, esta vez mayor, de 0,831 ciclos logarítmicos. En vista de los resultados se observa que no solo tras los tratamientos dos y tres, no se produce inactivación bacteriana, sino que además se observa un crecimiento de la población. Esta tendencia puede indicar que *S. Typhimurium* desarrolla una resistencia cuando se expone repetidamente a la infusión de subproducto de coliflor al 5%.

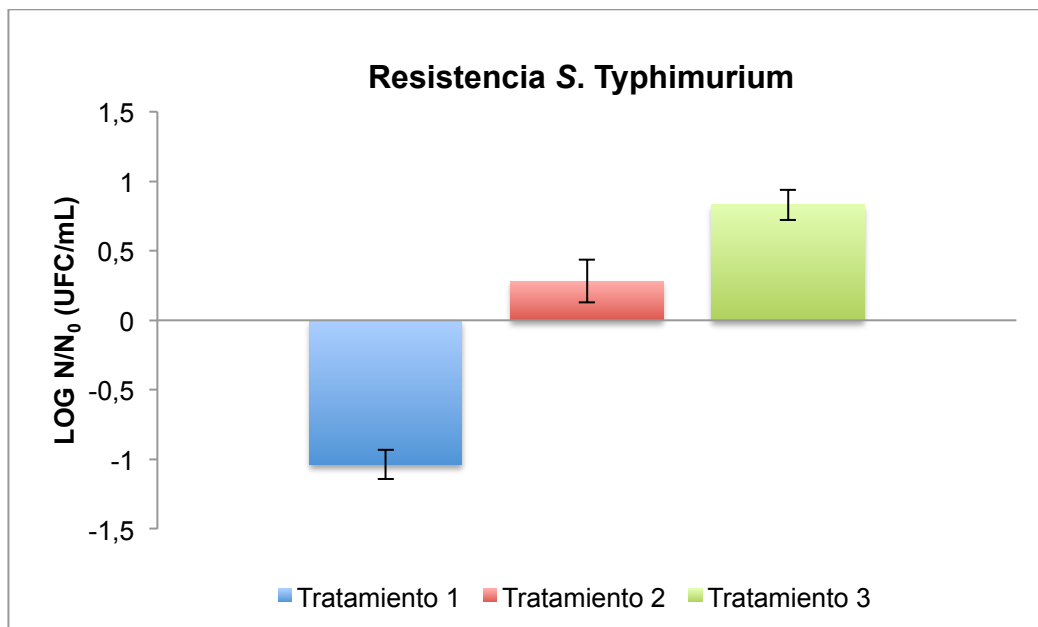


FIGURA 4. Gráfica de la resistencia de *S. Typhimurium* frente a los tratamientos con infusión de subproducto de coliflor al 5%.

La resistencia supone una adaptación en la que se evidencian cambios estructurales y/o funcionales de las células de los microorganismos implicados. La aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se intercambian características de resistencia o se reproducen de forma anómala. Existen numerosas resistencias a los antibióticos empleados tanto en humanos como en animales, como se ha mencionado con anterioridad, pero en este caso también aparecen en respuesta a la actividad repetida de un antimicrobiano natural. Por ello resulta necesario realizar nuevas investigaciones sobre esta adaptación por parte de los microorganismos ya que constituye un riesgo potencial que puede comprometer la inocuidad de los alimentos (Boxstael et al., 2012; Loudon et al., 2012; Torpdahl et al., 2013).

La capacidad antimicrobiana de la familia *Brassicaceae* ha sido demostrada con anterioridad en la industria alimentaria (Brandi et al., 2005, Wilson et al, 2011). La inactivación de los microorganismos en un alimento se produce cuando éstos se exponen a elementos que alteran sus estructuras celulares y/o sus funciones fisiológicas. La inactivación microbiana causada por el uso de antimicrobianos naturales sigue siendo objeto de estudio en la actualidad, ya que se ha observado que en algunos casos puede causar ciertas resistencias, en lugar de la muerte bacteriana. Por ello, al emplear estas nuevas tecnologías es necesario utilizar las condiciones adecuadas para inactivar a los microorganismos más resistentes previniendo al máximo la aparición de adaptaciones.

Evaluación de los posibles cambios de virulencia en *S. Typhimurium* utilizando como organismo modelo *C. elegans*

A partir de los resultados obtenidos de la resistencia de *S. Typhimurium* frente al antimicrobiano, se eligen dos poblaciones por ser las que más diferencias muestran entre sí en cuanto al daño y a la resistencia. Estas poblaciones son la población sometida a un tratamiento (de ahora en adelante *S. Typhimurium* 1) y la población sometida a tres tratamientos consecutivos (de ahora en adelante *S. Typhimurium* 3). Ambas se administran como alimento al nematodo *C. elegans* y los resultados se comparan con los obtenidos con *S. Typhimurium* sin tratar, utilizándose esta última como muestra patrón.

C. elegans se emplea como organismo modelo para el estudio de la virulencia de *S. Typhimurium*, analizando de forma independiente la esperanza de vida, la movilidad y la puesta de huevos del nematodo frente a las diferentes poblaciones bacterianas.

CAMBIOS EN LA ESPERANZA DE VIDA DE *C. elegans*

El ciclo de vida y la esperanza de vida de *C. elegans* está determinado por diversos factores ambientales como son la temperatura y la disponibilidad de recursos bacterianos para su alimentación (Allen et al.,



2015). Las altas temperaturas afectan negativamente a su ciclo de vida, pero a una temperatura constante de 20°C (temperatura óptima para su mantenimiento en un laboratorio) la vida promedio de un adulto de *C. elegans* es de 21 días (Sifri et al., 2005). En condiciones normales de laboratorio, *C. elegans* se alimenta de *E. coli* (cepa OP50). Cuando esta bacteria se sustituye por otra como *S. Typhimurium* la esperanza de vida del nematodo puede disminuir significativamente (Labrousse et al., 2000; Aballay et al., 2000).

En este ensayo se contrasta la longevidad de los nematodos y posteriormente se calcula el porcentaje de nematodos vivos dando lugar a las curvas de Kaplan-Meier. La figura 5 muestra el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* obtenido tras someter a los nematodos a una alimentación con la muestra patrón y con las muestras tratadas con el antimicrobiano. Como se observa en la gráfica (figura 5), el porcentaje de nematodos que sobrevive disminuye con el transcurso del tiempo en todos los grupos de estudio, siendo menor al 10% en torno al día 18 de vida. La esperanza de vida de los nematodos de la muestra patrón es de unos 21 días, mientras que en los nematodos alimentados con cepas de *S. Typhimurium* tratadas llegan a alcanzar una esperanza de vida de 23 días (*S. Typhimurium* 1) y de 25 días (*S. Typhimurium* 3). Además se evidencia que la tasa de supervivencia lo largo de los días es siempre mayor en los nematodos alimentados con las cepas tratadas en comparación con los nematodos alimentados con *S. Typhimurium* no tratada. No se han observado diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre las poblaciones sometidas a *S. Typhimurium* 1 y a *S. Typhimurium* 3. Lo que sí se observa es una diferencia entre *S. Typhimurium* no tratada y *S. Typhimurium* tratada una o tres veces, indistintamente. La virulencia de *S. Typhimurium* frente a *C. elegans* ha sido demostrada en numerosas investigaciones (Aballay et al., 2000; Labrousse et al., 2000). En cambio, una vez tratada con el antimicrobiano se producen una serie de cambios adaptativos o mutaciones por las que *S. Typhimurium* parece que se vuelve menos virulenta y además, como se indicó con anterioridad, también parece que se generan resistencias. Esto no difiere de otras investigaciones en las que se evidencia la resistencia de *S. Typhimurium* frente a numerosos antibióticos (Louden et al., 2012).

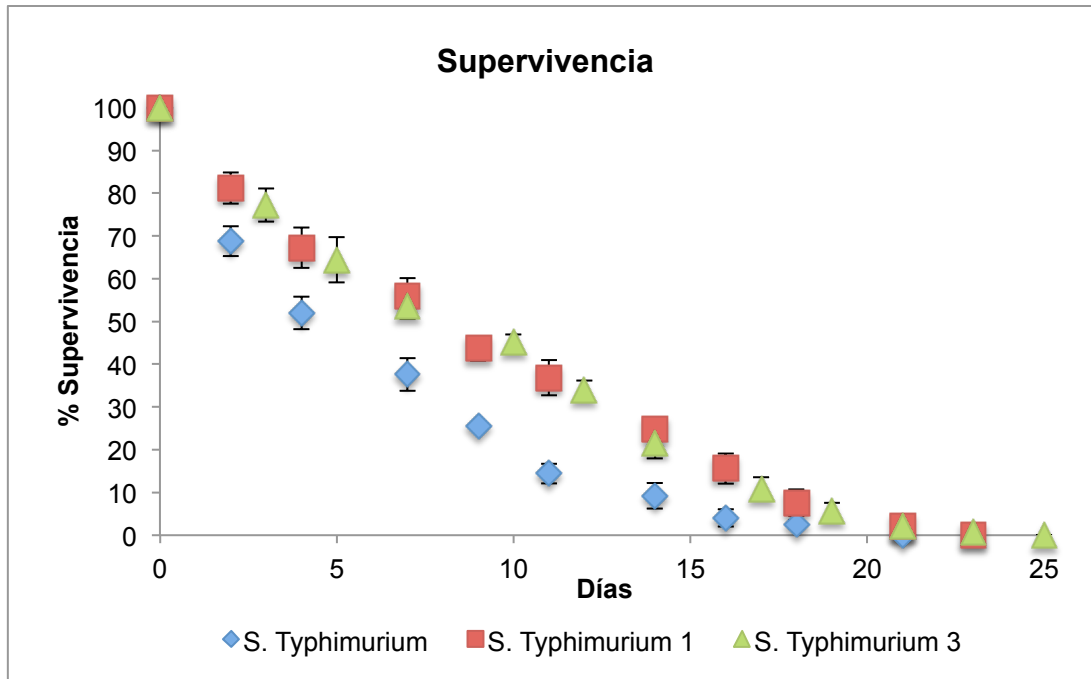


Figura 5. Gráfica de la supervivencia de *C. elegans* frente a los distintos grupos de estudio.

La tabla 1 muestra además los percentiles de la distribución de supervivencia estimada para las diferentes poblaciones de *S. Typhimurium* administrados al nematodo. Estos percentiles estiman el tiempo que un porcentaje de individuos va a sobrevivir. Como se puede observar el 5% de los nematodos sometidos a las poblaciones de *S. Typhimurium* tratadas sobreviven durante un periodo de 19,3 a 19,9 días, a diferencia del 5% de los nematodos sometidos a la muestra patrón que sólo sobreviven 16,5 días. Esto supone una diferencia de unos 3 días aproximadamente entre ambos grupos, lo cual para un organismo que vive de media 21 días supone una diferencia notoria. Con estos datos nuevamente se observa que no existen diferencias significativas (p -valor < 0.05) entre las poblaciones sometidas a *S. Typhimurium* tratada una o tres veces, pero sí entre las poblaciones alimentadas con *S. Typhimurium* sin tratar y la población alimentada con *S. Typhimurium* tratada con antimicrobianos y que esta diferencia es relevante.

Tabla 1. Tabla de percentiles para el periodo de vida de *C. elegans* frente a los distintos grupos de estudio.

Percentil	Tiempo (Días)		
	S. Typhimurium	S. Typhimurium 1	S. Typhimurium 3
75,0	2,4	3,9	3,3
50,0	5,3	8,5	8,2
25,0	10,2	13,9	13,4
10,0	13,8	18,4	17,3
5,0	16,5	19,9	19,3

La función de riesgo, obtenida mediante el análisis estadístico de Kaplan-Meier, se representa en la figura 6. En la gráfica se puede observar que la tasa de riesgo es siempre más elevada en los nematodos sometidos a la muestra patrón en comparación con los sometidos a las poblaciones de *S. Typhimurium* tratadas. La tasa de riesgo se mantiene más o menos constante en los tres grupos de estudio hasta el día 19, aunque cabe destacar que en la población de *S. Typhimurium* 1 el riesgo se dispara con anterioridad (día 17). Esto no difiere de los datos obtenidos con una alimentación a base de *E. coli*, donde la tasa de riesgo también se dispara el día 17. Por ello, este dato, puede coincidir con la edad del nematodo, ya que en torno al día 17, este se considera anciano y su sistema inmunitario estaría más débil y aguantaría menos el efecto adverso de *S. Typhimurium*.

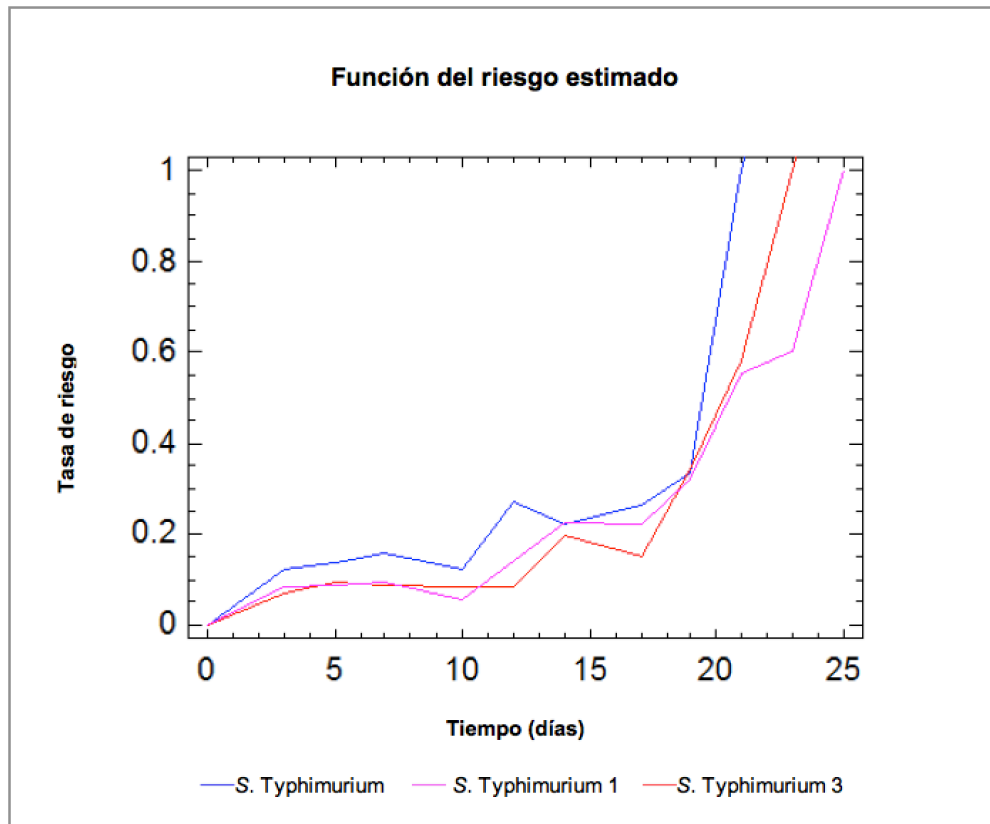


Figura 6. Curva de la función de riesgo de *C. elegans* frente a los distintos grupos de estudio.

CAMBIOS EN LA PUESTA DE HUEVOS *C. elegans*

El segundo objeto de estudio es la puesta de huevos de *C. elegans* ante las diferentes poblaciones bacterianas utilizadas como alimento. En condiciones normales un adulto de *C. elegans* hermafrodita es capaz de poner entre 300 y 350 huevos a lo largo de toda su vida (Lavigne et al., 2006). Los cambios en la puesta de huevos se han estudiado obteniendo un promedio del número de huevos por nematodo cada 48 horas y comparando estos con la muestra patrón, utilizando una población $n=25$ para cada objeto de estudio. Así se hace evidente que a partir del quinto día los nematodos alimentados con cada una de las poblaciones de *S. Typhimurium* dejan de poner huevos. Por ello se compara la puesta de huevos sólo hasta ese día. En la figura 7 se observa el número de huevos puesto para el nematodo alimentado con la población patrón y para los nematodos alimentados con las dos poblaciones sometidas a tratamientos antimicrobianos. Como se observa en la gráfica (figura 7) las diferencias entre las distintas poblaciones son significativas (p -valor < 0.05). Los nematodos alimentados con la población patrón ponen menos huevos, con una media de 17,64 huevos hasta el día 5, mientras que los nematodos alimentados con las cepas



tratadas ponen una media de 42,04 huevos si han sufrido sólo un tratamiento y de 97,28 huevos en caso de haber sufrido tres tratamientos consecutivos. Los resultados obtenidos no difieren de otros obtenidos en distintos estudios con respecto a *S. Typhimurium*, mostrando que esta puede afectar a la puesta de huevos (Aballay et al., 2000). Este resultado también puede evidenciar la disminución de la virulencia en las poblaciones tratadas con antimicrobiano frente a la población patrón.

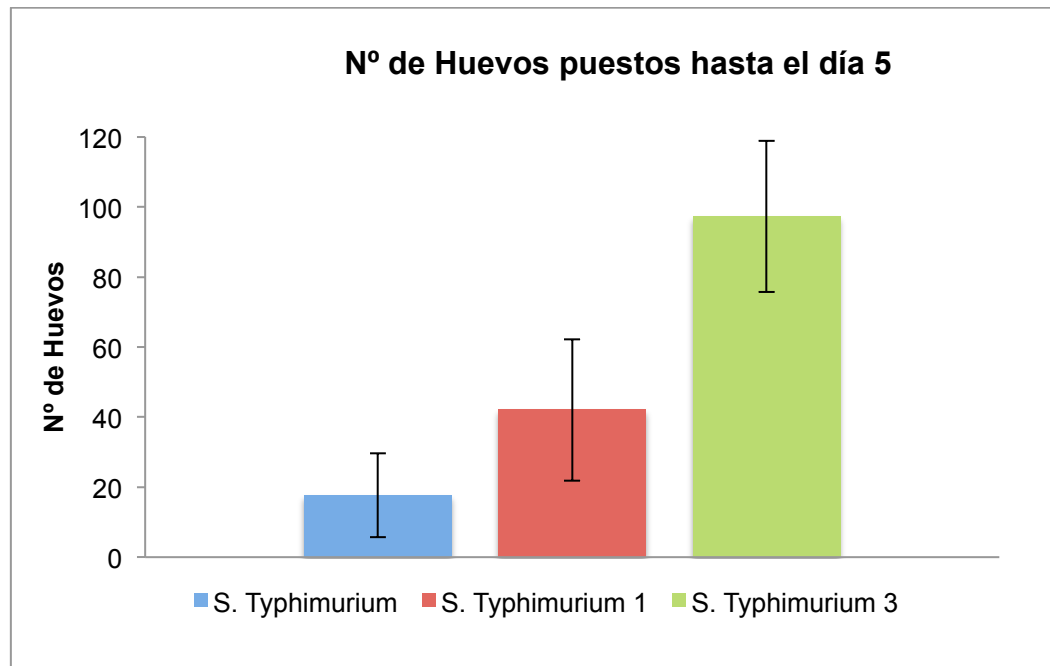


Figura 7. Gráfica de la puesta de huevos hasta el día 5 según el grupo de estudio.

CAMBIOS EN LA MOVILIDAD DE *C. elegans*

El tercer y último objeto de estudio se centró en la movilidad de *C. elegans* ante alimentado con las diferentes poblaciones bacterianas. Para ello se emplea una población $n=25$ para cada grupo de estudio. Como se observa en la figura 8 la movilidad de los nematodos se va perdiendo en todas las poblaciones. La única diferencia significativa es que en las poblaciones tratadas sí se observa una mayor movilidad durante los cinco primeros días. Los nematodos de la muestra patrón presentan una media de 0,42 movimientos por segundo, mientras que los nematodos de *S. Typhimurium* 1 presentan una movilidad de 0,81 movimientos por segundo y los nematodos de *S. Typhimurium* 3 presentan una movilidad de 0,82 movimientos por segundo. Este aumento de la movilidad coincide además con el aumento en la puesta de huevos los primeros cinco días. También cabe destacar que los nematodos sometidos a la muestra patrón dejan de moverse antes (día 17) que los nematodos sometidos a las poblaciones tratadas (hasta el día 19).

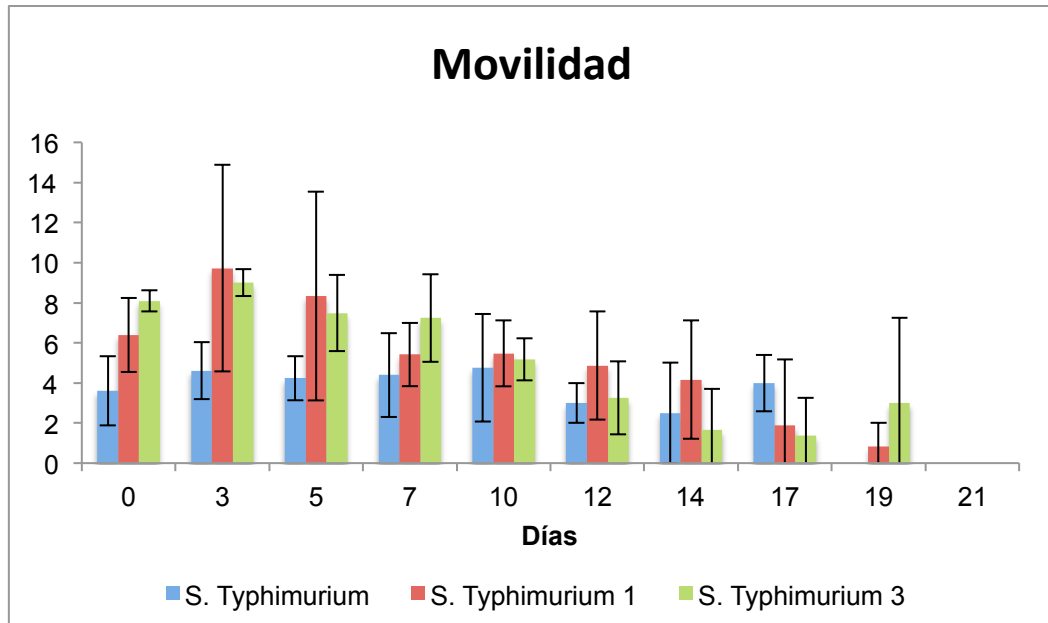


Figura 8. Gráfica de la movilidad de *C. elegans* a lo largo de su ciclo de vida según el grupo de estudio.

CONCLUSIONES

- La realización de tratamientos consecutivos con el antimicrobiano objeto de estudio parece aumentar la resistencia de *S. Typhimurium*.
- La esperanza de vida de *C. elegans* es mayor cuando este se alimenta con las cepas de *S. Typhimurium* tratadas con el antimicrobiano natural en comparación con *S. Typhimurium* sin tratar.
- El riesgo es mayor en los nematodos alimentados con *S. Typhimurium* sin tratar en comparación con los nematodos alimentados con *S. Typhimurium* 1 y *S. Typhimurium* 3.
- *S. Typhimurium* tratada y sin tratar altera el sistema reproductivo de *C. elegans*, produciendo el cese de la puesta de huevos a partir del quinto día de vida.
- El tratamiento con antimicrobianos hace que los nematodos alimentados con *S. Typhimurium* tratadas pongan más huevos durante esos 5 primeros días.
- El uso de microscopía electrónica permitiría estudiar con más detalle los cambios en la fisiología del sistema reproductor de *C. elegans*.
- Los nematodos sometidos a poblaciones de *S. Typhimurium* tratadas se mueven más durante los primeros cinco días.

- En vista de todos los resultados se puede decir que la exposición continuada de *S. Typhimurium* al antimicrobiano objeto del estudio produce una disminución en su virulencia al mismo tiempo que se incrementa la resistencia al antimicrobiano. No obstante, sería conveniente seguir investigando acerca de la resistencia de *S. Typhimurium* frente a otros antimicrobianos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) y a la Universitat Politècnica de València por facilitarme los medios necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Antonio Martínez y la Dra. María Dolores Rodrigo por su entrega y por guiarme y tutelarme durante la realización de este estudio.

A Maria Sanz, directora experimental, por su especial dedicación y por enseñarme todo lo que aprendido durante mi estancia en el IATA.

REFERENCIAS

Aballay, A.; Ausubel, F.M. 2002. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 97-101.

Aballay, A.; Yorgey, P.; Ausubel, F.M. 2000. *Salmonella* Typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 10, 1539-1542.

Allen, E.N.; Ren, J.; Zhang, Y.; Alcedo, J. 2015. Sensory systems: Their impact on *C. elegans* survival. *Neuroscience*, 296, 15-25.

Brandi, G.; Amagliani, G.; Schiavano, G.F.; De Santi, M.; Sisti, M. 2005. Activity of Brassica oleracea Leaf Juice on Foodborne Pathogenic Bacteria.

Boxstael, S.V.; Dierick, K.; Van Huffel, X.; Uyttendaele, M.; Berkvens, D.; Herman, L.; Bertrand, S.; Wildemaue, C.; Catry, B.; Butaye, P.; Imberechts, H. 2012. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Research International*, 45, 913-918.

Center for Food Safety and Applied Nutrition, of the Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. 2012. *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. 2nd Edition.

Darby, C. 2005. Interactions with microbial pathogens. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* research community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.21.1, <http://www.wormbook.org>.

EFSA European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 13(2): 4036.

EFSA European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 4329.

EFSA European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. Cluster of monophasic *Salmonella* Typhimurium with previously unseen MLVA pattern in the EU/EEA. EFSA supporting publication, EN-657.



EFSA European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "Salmonella Typhimurium-like" strains. *EFSA Journal*, 8(10): 1826.

Hart, A.C. 2006. Behaviour. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* research community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, <http://www.wormbook.org>.

Hu, S.H.; Wang, J.C.; Kung, H.F.; Wang, J.T.; Lee, W.L.; Yang, Y.H. 2004. Antimicrobial Effect of Extracts of Cruciferous Vegetables. *Kaohsiung Journal of Medical Science* 20, 9-591.

Labrousse, A.; Chauvet, S.; Couillault, C.; Kurz, C.L.; Ewbank, J.J. 2000. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Current Biology*, 10, 1543-1545.

Lavigne, J.P.; Blanc-Potard, A.B.; Bourg, G.; Callaghan, D.O.; Sotto, A. 2006. *Caenorhabditis elegans*: modèle d'étude in vivo de la virulence bactérienne. *Pathologie Biologie*, 54, 439-446.

Laws, T.R.; Harding, S.V.; Smith, M.P.; Atkins, T.P.; Titball, R.W. 2004. Age influences resistance of *Caenorhabditis elegans* to killing by pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 234, 281-287.

Louden, B.C.; Haarmann, D.; Han, J.; Foley, S.L.; Lynne, A.M. 2012. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food animals in the U.S. *Food Research International*, 45, 968-972.

Sanz-Puig, M.; Pina-Pérez, M.C.; Rodrigo, D.; Martínez-López, A. 2014. Antimicrobial activity of cauliflower (*Brassica oleracea* var. Botrytis) by-product against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 50, 435-440.

Sifri, C.D.; Begun, J.; Ausubel, M. 2005. The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *TRENDS in Microbiology*, 13(3).

Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *Wormbook*, ed. The *C. elegans* research community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

Sung, W.S.; Lee, D.G. 2007. In vitro antimicrobial activity and the mode of action of indole-3-carbinol against human pathogenic microorganisms. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30(10), 9-1865.

Tenor, J.L.; McCormick, B.A.; Ausubel, F.M.; Aballay, A. 2004. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Current Biology*, 14, 1018-1024.

Torpdahl, M.; Lauderdale, T.L.; Liang, S.Y.; Li, I.; Wei, I.L.; Chiou, C.S. 2013. Human isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium from Taiwan displayed significantly higher levels of antimicrobial resistance than those from Denmark. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 69-75.

Wilson, A.E.; Bergaentzlé, M.; Bindler, F.; Marchioni, E.; Lintz, A. 2011. In vitro efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as antimicrobial agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 30, 318-324.